

**A HYN HIDROGENÁZ ALEGYSÉGEINEK VIZSGÁLATA**  
***THIOCAPSA ROSEOPERSICINA* BBS-BEN**

**Ph.D. értekezés**

**Palágyi-Mészáros Livia Sarolta**

Témavezetők:

**Dr. Rákhely Gábor**

**Prof. Kovács Kornél**

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék

MTA Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézet

**2009.**

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>TARTALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>2</b>
<b>1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....</b>	<b>5</b>
<b>2. BEVEZETÉS.....</b>	<b>6</b>
<b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1. MIKROBIÁLIS HIDROGÉN METABOLIZMUS .....</b>	<b>8</b>
<b>3.2. A HIDROGENÁZOK OSZTÁLYOZÁSA .....</b>	<b>9</b>
3.2.1. A [NiFe] HIDROGENÁZOK CSOPORTOSÍTÁSA LOKALIZÁCIÓ ALAPJÁN:.....	9
3.2.2. A HIDROGENÁZOK OSZTÁLYOZÁSA AZ AKTÍV CENTRUM FÉMTARTALMA ALAPJÁN: .....	10
3.2.2.1. <i>Hmd</i> vagy <i>[Fe]</i> hidrogenázok.....	10
3.2.2.2. <i>[FeFe]</i> hidrogenázok.....	10
3.2.2.3. <i>[NiFe]</i> hidrogenázok: .....	11
<b>3.3. MEMBRÁN KÖTÖTT PERIPLAZMATIKUS [NIFE] HIDROGENÁZOK .....</b>	<b>12</b>
<b>3.4. A [NIFE] HIDROGENÁZOK ÉRÉSE .....</b>	<b>13</b>
<b>3.5. A HIDROGENÁZOK TRANSPORTJA .....</b>	<b>13</b>
<b>3.6. A [NIFE] HIDROGENÁZOK REGULÁCIÓJA .....</b>	<b>14</b>
<b>3.7. THIOCAPSA ROSEOPERSICINA BBS.....</b>	<b>15</b>
<b>3.8. A THIOCAPSA ROSEOPERSICINA HIDROGENÁZAI.....</b>	<b>16</b>
3.8.1. A szolubilis <i>Hox1</i> hidrogenáz .....	16
3.8.2. A szolubilis <i>Hox2</i> hidrogenáz.....	17
3.8.3. A membrán kötött <i>Hup</i> hidrogenáz .....	17
3.8.4. Regulátor hidrogenáz .....	18
3.8.5. <i>Hyn</i> hidrogenáz.....	18
<b>3.9. KÉNANYAGCSERE FOTOTRÓF KÉNBAKTÉRIUMOKBAN.....</b>	<b>19</b>
<b>3.10. A THIOCAPSA ROSEOPERSICINA HIDROGÉN- ÉS KÉNANYAGCSERÉJÉNEK FENOMENOLOGIKUS KAPCSOLATA .....</b>	<b>20</b>
<b>3.11. GENOMSZEKVENÁLÁSI MÓDSZEREK .....</b>	<b>21</b>
3.11.1. Hierarchikus shotgun szekvenálás (klónról klónra történő shotgun szekvenálás, direkt módszer) .....	21
3.11.2. A teljes genom shotgun módszerrel való szekvenálása .....	22
3.11.3. Hibrid könyvtár készítés .....	23
3.11.4. Primer séta.....	23
3.11.5. 454 szekvenálás (piroszekvenálás).....	24
3.11.6. Bioinformatika .....	25
3.11.6.1. A szekvenciák összeillesztése .....	25
3.11.6.2. Annotálás.....	26
<b>4. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>28</b>
<b>5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....</b>	<b>29</b>
<b>5.1. BAKTÉRIUM TÖRZSEK ÉS PLAZMIDOK.....</b>	<b>29</b>
5.1.1. <i>E. COLI</i> TÖRZSEK .....	29
5.1.2. <i>T. ROSEOPERSICINA</i> TÖRZSEK .....	29
5.1.3. PLAZMIDOK .....	30
5.1.3.1. Az <i>Isp2</i> fehérje pontmutációjához használt plazmidok .....	31
5.1.4. PRIMEREK .....	32
5.1.4.1. <i>Isp2</i> pontmutációhoz használt primerek.....	33

<b>5.2. OLDATOK .....</b>	<b>34</b>
<b>5.3. BAKTÉRIUMOK TENYÉSZTÉSE .....</b>	<b>34</b>
<b>5.4. RNS-EL VÉGZETT MUNKÁK .....</b>	<b>34</b>
5.4.1. RNS IZOLÁLÁS .....	34
5.4.2. DNÁZ I KEZELÉS .....	35
5.4.3. REVERZ TRANZKRIPCIÓ .....	35
<b>5.5. DNS MANIPULÁCIÓK .....</b>	<b>35</b>
5.5.1. GENOMI DNS IZOLÁLÁS <i>T. ROSEOPERSICINA</i> -BÓL .....	35
5.5.2. PLAZMID DNS TISZTÍTÁSA <i>E. COLI</i> -BÓL .....	36
5.5.3. AGARÓZ GÉLELEKTROFORÉZIS .....	36
5.5.4. FRAGMENT IZOLÁLÁS .....	36
5.5.5. EMÉSZTÉSEK RESTRIKCIÓS ENZIMEKKEL .....	37
5.5.6. DNS VÉGEK TOMPÍTÁSA T4-POLIMERÁZZAL ÉS KLENOW-POLIMERÁZZAL .....	37
5.5.7. POLINUKLEOTID KINÁZ KEZELÉS .....	37
5.5.8. LIGÁLÁS .....	37
5.5.9. KÉMIAI KOMPETENS SEJT KÉSZÍTÉS .....	38
5.5.10. KÉMIAI TRANSZFORMÁLÁS .....	38
5.5.11. ELEKTROKOMPETENS SEJT KÉSZÍTÉS .....	38
5.5.12. ELEKTROPORÁLÁS .....	38
5.5.13. POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ .....	39
5.5.14. NUKLEOTIDSORREND MEGHATÁROZÁSA .....	39
5.5.15. SHOTGUN KÖNYVTÁR KÉSZÍTÉSE .....	40
5.5.16. KOZMID KÖNYVTÁR KÉSZÍTÉSE .....	40
5.5.17. IRÁNYÍTOTT MUTAGENEZIS .....	41
5.5.18. AZ <i>Isp2</i> TERMELTETÉSÉRE HASZNÁLT KONSTRUKCIÓ KÉSZÍTÉSE (PAT- <i>Isp2</i> ) .....	41
5.5.19. A FEHÉRJE EXPRESSZIÓS VIZSGÁLATOKHOZ HASZNÁLT PLAZMID KÉSZÍTÉSE (PTSH51/1) .....	41
5.5.20. IN FRAME DELÉCIÓS MUTÁNSOK KÉSZÍTÉSE .....	42
5.5.20.1. Az <i>isp1</i> és <i>isp2</i> gén mutációja ( <i>ISP12M</i> ) .....	42
5.5.20.2. Az <i>Isp1</i> gén mutációja ( <i>ISP1M</i> ) .....	42
5.5.21. KOMPLEMENTÁLÓ KONSTRUKCIÓK KÉSZÍTÉSE .....	42
5.5.21.1. <i>pKIS1</i> .....	42
5.5.21.2. <i>pKIST4</i> .....	43
5.5.22. PONTMUTÁNSOK KÉSZÍTÉSE .....	43
<b>5.6. FEHÉRJEMUNKÁK .....</b>	<b>43</b>
5.6.1. AZ <i>ISP1-isp2</i> GÉNEK TRANZLÁCIÓS ANALÍZISE .....	43
5.6.2. HETEROLÓG FEHÉRJE EXPRESSZIÓ .....	44
5.6.3. SEJT FELTÁRÁS .....	44
5.6.4. HIS-TAG FÚZIÓS FEHÉRJE TISZTÍTÁSA MCAC (METAL-CHELATE AFFINITY CHROMATOGRAPHY) MÓDSZERREL, DENATURÁLÓ KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT .....	45
5.6.5. DENATURÁLÓ POLIAKRILAMID GÉLELEKTROFORÉZIS (SDS-PAGE) .....	45
5.6.6. EZÜSTFESTÉS .....	45
5.6.7. COOMASSIE BB FESTÉS .....	46
5.6.8. FEHÉRJE MENNYISÉGI MÉRÉSE LOWRY MÓDSZERREL (MICRO-LOWRY MÓDSZER) .....	46
<b>5.7. HIDROGENÁZ AKTIVITÁS MÉRÉSEI MÓDSZEREK .....</b>	<b>46</b>
5.7.1. IN VIVO HIDROGÉN TERMELÉS - VISSZAVÉTEL MÉRÉSE GÁZKROMATOGRÁFFAL .....	46
5.7.2. HIDROGÉN FELVÉTEL MÉRÉSE <i>IN VITRO</i> MESTERSÉGES ELEKTRON AKCEPTOR JELENLÉTÉBEN .....	47
5.7.3. HIDROGÉNTERMELÉS MÉRÉSE <i>IN VITRO</i> MESTERSÉGES ELEKTRONDONOR JELENLÉTÉBEN .....	47
<b>5.8. SZOLUBILIS- ÉS MEMBRÁNFRAKCIÓK SZÉTVÁLASZTÁSA .....</b>	<b>47</b>
<b>5.9. BAKTERIOKLOROFILL MENNYISÉGÉNEK MEGHATÁROZÁSA .....</b>	<b>48</b>
<b>6. EREDMÉNYEK ÉS TÁRGYALÁSUK .....</b>	<b>49</b>
<b>6.1. A <i>HYN</i> OPERON JELLEMZÉSE .....</b>	<b>49</b>

6.1.1. A <i>HYNH</i> GÉN JELLEMZÉSE.....	49
6.1.2. AZ <i>ISP1-ISP2</i> GÉNEK .....	49
6.1.3. A <i>HYNS-ISP1-ISP2-HYNL</i> GÉNEK TRANSZKRIPCIÓJÁNAK ANALÍZISE.....	50
6.1.4. AZ <i>ISP1-ISP2</i> FEHÉRJÉK VIZSGÁLATA T7 EXPRESSZIÓS RENDSZERREL .....	50
<b>6.2. AZ <i>ISP2</i> FEHÉRJE TÚLTERMELTETÉSE <i>E. COLI</i>-BAN .....</b>	<b>52</b>
<b>6.3. AZ <i>ISP1</i> FEHÉRJE TÚLTERMELTETÉSE <i>E. COLI</i>-BAN .....</b>	<b>53</b>
<b>6.4. A <i>ISP1</i> ÉS 2 FEHÉRJÉK MUTÁCIÓJA .....</b>	<b>53</b>
<b>6.5. AZ <i>ISP2</i> KONZERVÁLT AMINOSAVAINAK VIZSGÁLATA .....</b>	<b>58</b>
<b>6.6. A <i>HYN</i> HIDROGENÁZ ÉS A KÉNANYAGCSERE KAPCSOLATA <i>T. ROSEOPERSICINA</i> BBS-BEN.....</b>	<b>62</b>
<b>6.7. A <i>T. ROSEOPERSICINA</i> GENOMSZEKVENÁLÁSA.....</b>	<b>63</b>
6.7.1. KIS GENOMI INSZERTEKET TARTALMAZÓ “SHUTGUN” GENOMI KÖNYVTÁR KÉSZÍTÉSE.....	64
6.7.2. KOZMID KÖNYVTÁR KÉSZÍTÉSE .....	65
6.7.3. 454 SEKVENÁLÁS.....	67
6.7.4. A HIBRID GENOMSZEKVENÁLÁSSAL KAPOTT EREDMÉNYEK.....	67
6.7.5. GÉNEK AZONOSÍTÁSA A GENOMBAN.....	68
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>70</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>72</b>
<b>9. KÖZLEMÉNYEK.....</b>	<b>74</b>
<b>10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>75</b>
<b>11. HIVATKOZÁSOK LISTÁJA .....</b>	<b>76</b>



## **1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

EDTA: Etiléndiamin-tetraecetsav

PCR: Polimeráz Láncreakció

rpm: percenkénti fordulatszám

Amp: Ampicillin

Str: Streptomycin

Km: Kanamicin

Er: Eritromicin

Gm: Gentamicin

GCU: gázkromatográfiás egység

ORF: nyitott leolvasási keret

PC: fotoautotróf körülmények

NAD: nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADP: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

FTIR: Fourier-transzformációs infravörös spektrometria

EPR: elektrospin rezonancia spektroszkópia

TMAO: trimetilanin-N-oxid

DMSO: dimetil- szulfoxid

RNS: ribonukleinsav

DNS: dezoxiribonukleinsav

dNTP: dezoxinukleozid trifoszfát

DEPC: dietil-pirokarbonát

DnázI: dezoxiribonukleáz I

rATP: ribo- adenzin trifoszfát

SDS-PAGE: denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin

DTT: 1,4- dithiotreitol

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

## **2. BEVEZETÉS**

Napjaink egyik legnagyobb problémája az emberiség egyre növekvő energiaigényének kielégítése. Az előző évszázad technikai vívmányai jelentősen megkönnyítették, kényelmesebbé tették az emberek életét, azonban általuk az energiafelhasználás nagyságrendekkel növekedett.

A legnagyobb mennyiségben rendelkezésünkre álló energiaforrás a napenergia, amelyet a fotoszintetizáló élőlények képesek hasznosítani és segítségével szervetlen szénvegyületeket szerves anyagokká alakítani. Végso soron ez képezi szinte minden élet alapját. Az élő anyagok elpusztulásával biomassza képződött, ami évmilliók alatt alakul át szerves (fosszilis) energiahordozóvá. Jelenleg ezen energahordozók tartalékainak egyre nagyobb arányú kiaknázása folyik, miközben a Föld készletei erősen kimerülőben vannak (Cammack és mts., 2001, Pimentel 1991). A fosszilis energiahordozók azonban az elégetésükből származó nagy mennyiségű CO<sub>2</sub> miatt jelentősen növelik az üvegházhatást is, visszafordíthatatlan változásokat okozva a Föld légkörében. A világ gazdaságát egyre jobban aggasztó problémákra a megoldást az alternatív energahordozók jelenthetik.

A fosszilis energiahordozókat potenciálisan felváltó alternatív energiahordozókkal kapcsolatban alapvető követelmény, hogy megújuló forrásból származzanak, hosszú távon képesek legyenek kielégíteni az energia igényeket. Emellett ne legyenek károsak a környezetre, hiszen a jelenleg nagy mennyiségben használt energiahordozók komoly problémát jelentenek a természet számára. A napenergia közvetlen módon történő hasznosítása az egyik legígéretesebb lehetőség, amennyiben találunk olyan energiahordozót, amivé a napenergia nagy hatékonysággal átalakítható és az ebből történő energiafelszabadítás minél kevesebb károsanyag kibocsátással jár (Tromp és mts., 2003).

A hidrogén megfelel mindezeknek a követelményeknek (Cammack és mts., 2001, Moy, 2003). Előállítás leggyakrabban vízbontással történik: a vízmolekulából O<sub>2</sub> és H<sub>2</sub> keletkezik, ez azonban energiaigényes folyamat.

Számos fizikai, kémiai módszer képes a napenergiát hasznosítani, és az így nyert energiával vizet bontani. A módszerek hatékonysága még nem kielégítő, emellett sok esetben a szükséges félvezető anyagokból, kémiai vegyületekből rendelkezésre álló készletek végesek.

A természetben a fotoszintetizáló élőlények is képesek vízbontásra, fotorendszerük segítségével katalizálják a folyamatot, miközben O<sub>2</sub>-t fejlesztenek. A fotoszintetikus vízbontás során felszabaduló elektronok bizonyos körülmények között H<sub>2</sub> fejlesztésre használható.

A biológiai rendszerek előnye, hogy az alkalmazott katalizátorok (enzimek vagy egész sejtek) "megújulóak", viszonylag könnyű őket előállítani és a szükséges anyagokból kimeríthetetlen készletek állnak rendelkezésre.

A biológiai rendszerekben két olyan enzimes család van, amely képes hidrogén termelésére vagy oxidációjára, ezek a hidrogenázok illetve a nitrogenázok. A hidrogenázok azok az enzimek, amelyek valóban a hidrogén-metabolizmusra specializálódtak, míg a nitrogenázok elsődleges feladata a légkör molekuláris nitrogénjének redukciója, mely során jelentős mennyiségű H<sub>2</sub> képződik. Hidrogén termeltethető egész sejtekkel illetve izolált enzimekkel is. A két módszer más-más megfontolásokat, fejlesztéseket igényel. Mindenesetre a biológiai hidrogéntermelés gazdaságos megoldásához ismernünk kell az enzimek pontos működését, valamint módosítanunk kell őket a jobb és hatékonyabb működés érdekében, meg kell teremtenünk az ipari léptékű felhasználáshoz szükséges körülményeket (Cammack és mts., 2001). A nagy mennyiségben történő hidrogén termelésre vannak kísérletek, például fotoszintetizáló organizmusokkal (pl. vízbontásra is képes zöldalgákkal (Ghirardi és mts., 2007)), vagy anaerob módon fotoszintetizáló bíbor fotoszintetikus baktériumokkal. Ezek direkt módszerek abban a tekintetben, hogy a fényenergiát megkötő és hidrogént termelő organizmus egy és ugyanaz. Indirekt módszer esetén a napfény segítségével képződő biomasszát alakítjuk sötét fermentációval hidrogénné. A hidrogenáz enzimekkel is vannak nagy léptékű kísérletek, például az enzimek elektródokon való rögzítése és ennek segítségével történő hidrogén termelés (Armstrong és mts., 2009), valamint hidrogénbontó rendszerekben használják őket platina-palládium katalizátorok alternatíváiként.

A hidrogenázok segítségével történő hidrogéntermelés valamint hidrogénbontás megfelelő mennyiségű és katalitikus aktivitású stabil enzimet kíván, amely előállítása a biotechnológia kutatások feladata.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. MIKROBIÁLIS HIDROGÉN METABOLIZMUS

A mikroorganizmusok jelentős része használ hidrogént metabolikus folyamataiban. A hidrogén anyagcsere két kulcsenzime a sejtekben a hidrogenáz és a nitrogenáz. A nitrogenáz enzimrendszer a légkörben található molekuláris nitrogén megkötését végzi a folyamat melléktermékeként pedig hidrogén keletkezik, amely kikerül a légkörbe (Ghirardi és mts. 2007).

A hidrogenázok olyan metalloenzimek, amelyek képesek a hidrogén bontását és képződését is katalizálni (Cammack és mts. 2001, Vignais és Billoud 2007, Vignais 2008).



A reakció reverzibilis és iránya az enzimmel kölcsönható másik partner illetve a  $\text{H}_2/\text{H}^+$  aktuális redox potenciáljától függ.

Az enzimek *in vivo* funkciója többféle lehet, egyrészt működhetnek hidrogén visszavétel irányában, másrészt hidrogéntermelő enzimként. Vannak olyan hidrogenázok, amelyek mindkét folyamatot képesek katalizálni az aktuális fiziológiai redox állapottól függően, *in vitro* körülmények között, mesterséges elektrondonor jelenlétében azonban általában mind a hidrogéntermelési, mind a hidrogén visszavételi irányban tudnak működni (Vignais és Billoud 2007, Vignais 2008).

A hidrogenáz enzimek Archaeabaktériumokban és Eubaktériumokban egyaránt megtalálhatóak, de néhány egysejtű Eukarióta organizmusban is fellelhetőek (Vignais 2007). Az enzimek szerepe is különböző lehet a különböző körülmények között élő organizmusokban. Számos mikroba használ molekuláris hidrogént elektron donorként a különböző energia-konzerváló folyamatokhoz pl. fotoszintetikus  $\text{CO}_2$  asszimiláció, metanogenezis, anaerob respiráció (Vignais és Billoud 2001, Vignais 2008). Az elektronok felhasználásával szolubilis kofaktorok redukálódnak ( $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ , F420 stb.), vagy elektron-transzportláncra kerülnek, amely a végső elektronakceptorhoz ( $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_2$ , vagy fumarát) szállítja őket (Vignais és Billoud 2007, Vignais 2008). Fermentatív mikrobákban a hidrogén a felesleges redukáló-erő eltávolításához - és ezzel a kofaktorok regenerálásához - szükséges (Adams és mts. 1980).

Enterobaktériumokban egy formát-hidrogén liáz enzimkomplex (formátdehidrogenáz kapcsolt hidrogenáz) termeli a hidrogént (Andrews és mts. 1997, Sawers és mts. 1985).

Számos olyan mikroorganizmus létezik, amely nem csak egy hidrogenázt tartalmaz, hanem a különböző funkciók ellátására akár több különböző típusú enzimet is. A sejtekben található hidrogenázok különbözhetnek *in vivo* szerepükben, lokalizációjukban, redox partnereikben, felépítésükben. Az *Escherichia coli*-ban például két periplazmatikus, hidrogént oxidáló hidrogenáz található, valamint két másik enzim, melyek formát-hidrogén liáz komplex részei (Sawers és mts. 1985). Sok olyan periplazmatikus, membrán-kötött hidrogenáz létezik, melyek *in vivo* funkciója elsősorban a légkörben található H<sub>2</sub> visszavétele, és a légzési lánc felé továbbítják az elektronokat (Bernahard és mts. 1997). Egysejtű eukariótákban a hidrogenázok általában sejtorganellumokban helyezkednek el pl. a *Trichomonas vaginalis* esetében hidrogenozómákban, míg a *Clamydomonas reinhartii*-ban a kloroplasztokban (Bui és mts, 1996; Happe és mts, 2002).

A citoplazmában található, szolubilis hidrogenázok általánosan elterjedtek a hidrogenázt tartalmazó organizmusokban (pl. *Ralstonia eutropha*, *Desulfovibrio fructovorans*, *Thermococcus litoralis*) (Vignais és Billoud 2007, Rákhely és mts. 1999).

### 3.2. A HIDROGENÁZOK OSZTÁLYOZÁSA

A hidrogenázok különböző módon osztályozhatóak, pl. lokalizáció vagy funkció alapján.

#### 3.2.1. A [NiFe] HIDROGENÁZOK CSOPORTOSÍTÁSA LOKALIZÁCIÓ ALAPJÁN:

(Vignais 2001)

Membrán kötött, légzési lánchoz kapcsolt [NiFe]-hidrogenázok

Membrán kötött, periplazmatikus [NiFe]-hidrogenázok

Periplazmatikus, szolubilis [NiFe]-hidrogenázok a szulfát redukálókban

Membrán kötött archaealis hidrogén bontó [NiFe]-hidrogenázok

Citoplazmatikus heterodimer [NiFe] hidrogenázok

Cianobakteriális H<sub>2</sub>-bontó hidrogenázok

Szenzor hidrogenázok

Citoplazmatikus, reverzibilis [NiFe] hidrogenázok

Metanogének F<sub>420</sub> redukáló [NiFe] hidrogenázai

Hipertermofilek reverzibilis [NiFe] hidrogenázai

Metil-viologén redukáló [NiFe] hidrogenázok

Reverzibilis, NAD redukáló [NiFe] hidrogenázok

### 3.2.2. A HIDROGENÁZOK OSZTÁLYOZÁSA AZ AKTÍV CENTRUM FÉM-TARTALMA ALAPJÁN:

#### 3.2.2.1. Hmd vagy [Fe] hidrogenázok

Olyan homodimer enzimek, amelyek nem tartalmazzak FeS kockákat és az aktív centrumukban egyetlen Fe atom található egy speciális piridon kofaktorhoz kötötten (Shima és mts. 2007). *Methanothermobacter marburgensis*-ben fedezték fel őket és itt tanulmányozták a legintenzívebben. Jelenlétük csak akkor esszenciális a sejtekben, ha nem található nikkel forrás a tápoldatban, ekkor ugyanis az F420 redukáló hidrogenáz (Ffh) hiányzik a sejtekből. Lényeges különbség az alább ismertetendő [NiFe] és [Fe] hidrogenázoktól, hogy az aktív centrumban található vas nem redox aktív.

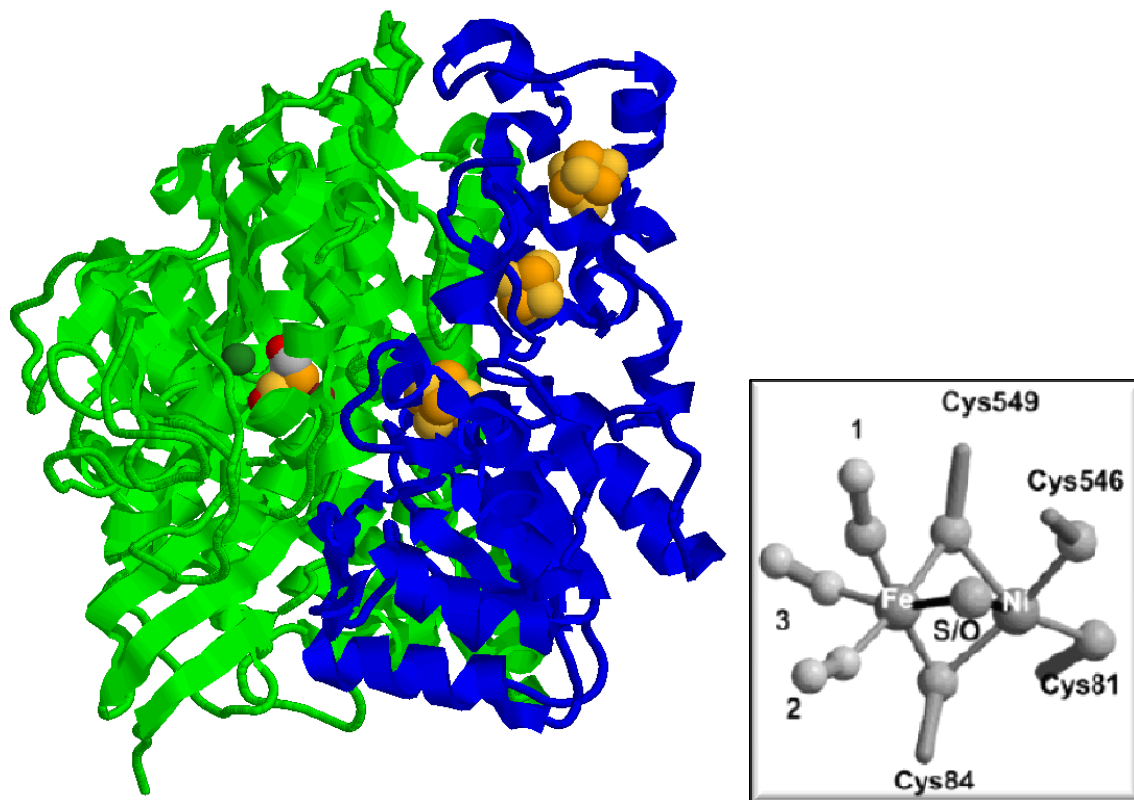
#### 3.2.2.2. [FeFe] hidrogenázok

aktív centrumukban (H-centrum) csak vas ionokat tartalmazznak (Cammack és mts. 2001). A H-centrumot minden hidrogenázra jellemző, négy, erősen konzervált cisztein rögzíti. Mindkét vashoz egy-egy CO és CN<sup>-</sup> ligand kötődik. Egy egyedi CO ligand pedig mind a két vashoz kötődik. Az aktív centrumhoz közvetlenül kapcsolódik egy [4Fe-4S] kocka. Ez, valamint további három [4Fe-4S] egység játszik szerepet az elektronok szállításában a fehérje felszíni régiói felé (Cammack és mts. 2001). A [FeFe] hidrogenázok között találunk monomereket, homodimereket, de akár trimer vagy tetramer szerkezetűeket is (Fritzsche és mts. 1999, Vignais és mts. 2001). A hidrogenáz struktúrféhérvén kívül egyéb féhérvék, kofaktoraik is kapcsolódhatnak a [FeFe] hidrogenázokhoz, pl. ferredoxin, citokróm c<sub>3</sub>, NAD(P)H, melyek a sejt egyéb metabolikus folyamataihoz való kapcsolódást biztosítják (Vignais és Billoud, 2007). Anaerob prokariótákban (pl. szulfát redukálók, a Clostridiales rend tagjai) és eukariótákban található. A [FeFe] hidrogenázok katalitikus alegységének mérete a [NiFe] hidrogenázoktól eltérően nagyon variábilis. A H-clustert egy erősen konzervált, kb. 350 aminosav hosszú régió tartalmazza (Forestier és mts. 2003), ehhez változó hosszúságú kiterjesztés tartozik az egyes féhérvékben, emellett több alegysége is lehet a féhérvének, amelyek leggyakrabban vas-kén kockák koordinálásában vesznek részt. A [FeFe] hidrogenázok aktív centrumának kialakulása

nem spontán folyamat: két-három olyan fehérje szükséges hozzá, amelyek a polipeptidlánc megszintetizálódása után a metallocentrum kialakításáért felelős (Posewitz és mts. 2004).

### 3.2.2.3. [NiFe] hidrogenázok:

Minimálisan heterodimer enzimek, melyekben a nagy alegység tartalmazza az aktív centrumot. Az alegységek mérete konzervált, a nagy alegység kb. 60 kDa, míg a kis alegység kb. 30 kDa. A [NiFe] aktív centrum a nagy alegységben található, melyet négy cisztein rögzít a fehérjéhez. A vashoz speciális ligandok, egy CO és két CN<sup>-</sup> csoport kapcsolódik (Volbeda és mts. 1996, Fontecilla-Camps és mts. 1997).



1. ábra: a *Desulfovibrio vulgaris* NiFe hidrogenáza

a, A nagy alegység az aktív centrummal zöld, a kis alegység, amely a vas-kén kockákat tartalmazza kék színnel van jelölve. b, A [NiFe] aktív centrum felépítése: négy cisztein koordinálja az aktív centrumot. Az 1 és 2 számmal jelölt ligandok a cianid molekulák, a 3-as pedig egy szénmonoxid. A S/O jelzés egy oxo- vagy hidroxó-hidat vagy sulfoxó-hidat jelöl a Ni és Fe atomok között az enzim oxidált, inaktív állapotában (Fontecilla-Camps és mts. 1997)

A *Ralstonia eutropha* citoplazmatikus  $\text{NAD}^+$  redukáló hidrogenáza esetén, FTIR és EPR spektroszkópiás vizsgálatok valószínűsítik két további  $\text{CN}^-$  ligand jelenlétét is, melyek közül az egyik a nikkellel kapcsolódik (Happe és mts. 2000). Egyes hidrogenázok aktív centrumában szelén is található, amely szelenocisztein formájában kapcsolódik a nikkellel (Sorgenfrei és mts. 1993). A kis alegységben vas-kén kockák találhatóak, melyek szerepe az elektronok szállítása az akceptor felé, illetve a donortól (1. ábra). Az aktív központhoz legközelebbi  $[\text{4Fe4S}]$  kocka esszenciális a hidrogén aktiválódásához (Fontecilla-Camps és mts. 1997).

### 3.3. MEMBRÁN KÖTÖTT PERIPLAZMATIKUS $[\text{NiFe}]$ HIDROGENÁZOK

Ebbe a csoportba tartoznak a membrán kötött respirációs enzimek, melyek segítségével a sejt képes a hidrogént energiaforrásként hasznosítani, a hidrogén oxidációja során képződő redukáló erőt anaerob elektron akceptorok, úgymint  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , fumarát,  $\text{CO}_2$  (anaerob légzés) vagy oxigén (aerob légzés) redukálására fordítani. A folyamatok közös lépésében a hidrogénből nyert elektronok a kinon raktárba kerülnek, amelyhez a különféle respirációs láncok is kapcsolódnak. A redukált kinonokról az elektronok a terminális elektron akceptorokra kerülnek miközben a sejtek az energiát transzmembrán elektrokémiai potenciál különbség formájában tárolják. A membránkötött hidrogenázok a respirációs lánc kinon raktárához egy harmadik alegységük, egy dihem citokró-m-b segítségével kapcsolódnak, amely a kis alegység hidrofób C-terminálisán keresztül horgonyozza le őket a membránhoz (Vignais és mts. 2004).

A felvevő hidrogenázok egy másik típusát képviselik a *Desulfovibrio* fajok periplazmatikus enzimeit, melyek képesek kölcsönhatásba lépni alacsony redox potenciálú c-típusú citokró-mokkal, és egy *a hmc* operon által kódolt transzmembrán redox fehérje komplexszel, ezáltal részt vesznek a transzmembrán elektrokémiai potenciál gradiens kialakításában (Rossi és mts. 1993).



### 3.4. A [NiFe] HIDROGENÁZOK ÉRÉSE

A [NiFe] hidrogenázok aktív centrumának kialakulása, a fehérje érése többlépcsős poszttranszlációs folyamat, amelyben számos kisegítő fehérje vesz részt. A kisegítő fehérjéket kódoló gének általában a kis és nagy alegység génjeinek közelében, azzal egy génklasztert alkotva helyezkednek el. A [FeFe] hidrogenázokhoz képest az érési folyamat sokkal több fehérjét igényel. Ma már elmondhatjuk hogy számos enzim esetén az összes ilyen fehérjetermék ismert, melyek felfedezését segítette az a tény is, hogy a [NiFe] hidrogenázok éréséhez szükséges fehérjék génjei általában a struktúrgének közelében helyezkednek el (Vignais és mts. 2007). A [NiFe] hidrogenázok érése legalább tíz különböző fehérjét igényel.

A hidrogenáz bioszintézis tanulmányozásának modellenzime az *Escherichia coli* 3-as hidrogenáza. A folyamat a nagy alegység (HycE) szintézisével kezdődik, melybe a HypCDEF fehérjék segítségével beépül a ligandokkal körülvett vas, melyet a HypAB enzimek által szállított nikkel enzimatiszinszerciója követ. A fémcentrum beépülése után egy endopeptidáz a nagy alegység C-terminális végéről eltávolít egy néhány aminosavból álló szakaszt (Theodoratou és mts. 1995, Theodoratou és mts. 2000). A proteolízis után a nagy alegység képes a kis alegységhez való kapcsolódásra. A fémcentrum előállításában és beépítésében, valamint az egyes lépések segítésében különböző fehérjék vesznek részt, melyek egy része enzim- illetve fajspecifikus, míg mások minden hidrogenáz éréséhez nélkülözhetetlenek.

A heterodimer felépítésen kívül vannak olyan [NiFe] hidrogenázok, amelyek egyéb alegységeket is tartalmaznak, ezek leggyakrabban az elektron szállításban játszanak szerepet, így kapcsolat biztosíthatása a sejt egyéb redox rendszereivel (pl. citokróm-b típusú alegység, diaforáz alegységek).

### 3.5. A HIDROGENÁZOK TRANSZPORTJA

Miután megtörtént a hidrogenáz érése, a kis és a nagy alegység összekapcsolódott, az enzim katalitikusan aktív lesz. A citoplazmatikus helyzetű hidrogenázok maradnak a citoplazmában, azonban a membránköthet enzimeknek ki kell jutniuk a periplazmatikus térbe. Mivel az enzim összeszerelődése a citoplazmában történik, míg a funkcióját a periplazmatikus

térben látja el, a teljesen érett fehérje szállításához egy különleges transzport útvonal kell. A hidrogenázok ehhez a Tat (Twin-arginine translocation) transzportot használják (Rodrigue és mts. 1999, Wu és mts. 2000, Sargent és mts. 2002). A Tat transzport útvonal egy 10 éve felfedezett transzport rendszer, amely jellegzetessége, hogy teljesen érett formában szállítja a fehérjéket (Berks és mts. 2000). Azok a fehérjék, amelyek ezt az útvonalat használják, jellegzetes ((S/T)-R-R-x-F-L-K) szekvenciát hordoznak az N terminálisukon. Általában olyan enzimek használják a Tat útvonalat, amelyek több alegységesek és fém kofaktort tartalmaznak (pl. TMAO reduktáz, DMSO reduktáz) (Palmer és mts. 2005). Általában az ezen úton szállított enzimek csak egyik alegysége tartalmazza a twin-arginin szignált, amely a hidrogenázok esetében a kis alegység.

A hidrogenázoknál a HypG és HupJ fehérjék (*E. coli*-nál HyaE és HybE), mint segítők játszanak szerepet a transzlokációban, kölcsönhatnak a hidrogenáz kis alegységével és a Tat transzlokázzal is (Dubini és Sargent 2003).

### 3.6. A [NiFe] HIDROGENÁZOK REGULÁCIÓJA

A hidrogenázok struktúrfehérjeinek valamint a kisegítő fehérjék termelődése is különböző faktorok szabályozása alatt áll.

A kis- és a nagy alegység génje a hidrogenázoknál minden esetben egy operonban kódolódik. Az operont kiegészíthetik egyéb olyan gének is, amelyek részt vesznek a hidrogenáz felépítésében (pl. elektron-transzfer alegységek a membránkötött, periplazmatikus hidrogenázoknál) illetve az érésben szerepet játszó, kisegítő fehérjék génjei is. A kisegítő fehérjék génjei általában együtt íródnak át a struktúrgénekkel, de előfordulhat, hogy különböző promóterek szabályozása alatt állnak (Cammack és mts. 2001, Casalot és Rousset 2001).

Több környezeti faktor van, ami befolyásolja a hidrogenázok működését a különböző organizmusokban, ilyen például N<sub>2</sub> fixáló körülmény az *Anabaena cylindarica*-nál (Tamagnini és mts. 2002), a szénforrás mennyisége (Sawers és mts. 1986), a légkörben található O<sub>2</sub> mennyisége *Rhizobium leguminosarum*-nál (Batut és mts. 1994), vagy a nikkel mennyisége *Bradyrhizobium japonicum*-nál (Kim és mts. 1990). Általában több faktor is befolyásolja egy-

egy hidrogenáz működését. Gyakori egy olyan négy aleggységes jelátviteli kaszkád jelenléte is (pl. *Ralstonia eutropha*-ban és *Rhodobacter capsulatus*-ban), amely képes a légkörben található hidrogén mennyiségének érzékelésén keresztül szabályozni a hidrogént oxidáló enzimek expresszióját (Lenz és mts. 2002).

Ennek a négy aleggységes szabályozó kaszkádnak az érzékelő komponense végső soron [NiFe] hidrogenáz (szenzor hidrogenáz), mely képes érzékelni a H<sub>2</sub> mennyiségét a légkörben. Ezen hidrogenázokból hiányzik azonban a hidrogenázokra jellemző és az aktív centrum kialakításában szerepet játszó C-terminális rész (Elsen és mts. 1996). *Rhodobacter capsulatus*-ban (Elsen és mts. 1996) és *Ralstonia eutropha*-ban (Lenz és Friedrich 1998) a HupUV(HoxBC) tetramer formát alkot a citoplazmában és érzékeli a hidrogén mennyiségét és befolyásolja a HupSL hidrogenáz transzkripcióját a HupT (HoxJ) és a HupR(HoxA) fehérjéken keresztül.

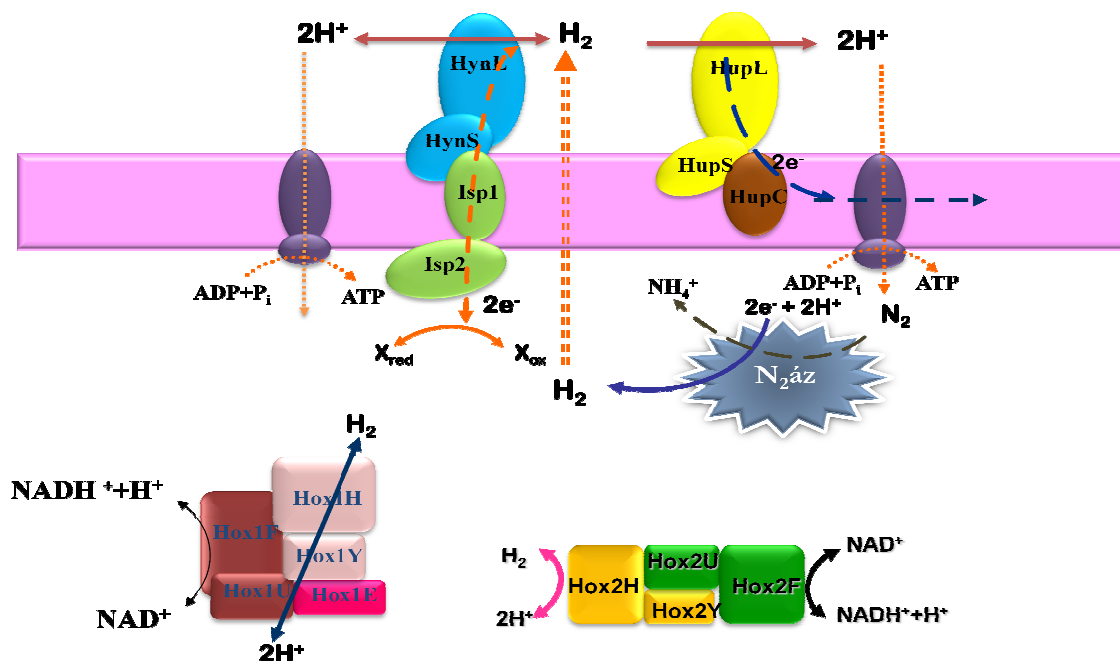
### 3.7. THIOCAPSA ROSEOPERSICINA BBS

A *Thiocapsa roseopersicina* egy Gram-negatív anaerob fotoszintetizáló bíbor kénbaktérium, amely a Chromatiaceae családba tartozik (Gogotov 1976, Pfennig és Trüpper 1991). A BBS nevű törzset eredetileg a Jeges-tengerből izolálták. Ellentétben a cianobaktériumokkal, melyek vizet bontanak és a fotoszintézis melléktermékeként oxigént termelnek, az anaerob fototróf baktériumok nem képesek a víz bontására, hanem alternatív elektronforrásra van szükségük. A kénbaktériumok értelemszerűen redukált kénvegyületeket (szulfid, tioszulfát, elemi kén stb.), vagy esetleg egyszerű szerves szubsztrátokat (pl. acetát) és molekuláris hidrogént hasznosítanak elektrondonorként a fotoszintetikus növekedés során. Nem termelnek oxigént, a fotoszintetikus elektronáram ciklikus, a CO<sub>2</sub> asszimilációhoz külső elektronforrást használnak. A sejtek belső, fotoszintetikus membránt tartalmaznak, szerves elektrondonor jelenlétében képesek egyedüli szénforrásként CO<sub>2</sub>-ot hasznosítani. Sötétben, aerob körülmények között is képesek növekedni szerves szubsztrát jelenlétében (Kondratieva és mts. 1976). Amennyiben a tápoldat nem tartalmaz nitrogénforrást, nitrogénáz enzimrendszere segítségével a légköri nitrogén megkötésére is képesek (Bogorov 1974), a folyamat melléktermékeként pedig H<sub>2</sub> képződik. A *T. roseopersicina* optimális növekedési hőmérséklete 25-28 °C, 30°C felett már nem képes növekedésre (Bogorov, 1974). Folyadékban 4-6 nap alatt éri el a stacionáris növekedési fázist, lemezen két hét alatt képez telepeket.

### 3.8. A *THIOCAPSA ROSEOPERSICINA* HIDROGENÁZAI

A *T. roseopersicina* négy, különböző típusú [NiFe] hidrogenáz enzimet tartalmaz (2. ábra) (Colbeau és mts. 1994, Rákhely és mts. 1998, Kovács és mts. 2002, Rákhely és mts. 2004, Maróti J. és mts. publikálás alatt), valamint egy regulátor hidrogenáz operont, melynek génjeiről (*hupTUV*) nem képződik aktív enzim (Kovács és mts. 2005). A Hup, Hyn, Hox hidrogenázok fehérje szinten is jellemzett enzimek, míg a nemrég felfedezett Hox2 hidrogenáz jellemzése jelenleg zajlik.

*T. roseopersicina*-ban a hidrogenázok felépítésében, valamint az érésükben szerepet játszó fehérjék génjei a genomban szétszórva találhatóak (Kovács és mts. 2005).



2. ábra: a *T. roseopersicina* hidrogenázai

#### 3.8.1. A SZOLUBILIS HOX1 HIDROGENÁZ

A Hox1 hidrogenáz a *hox1EFUYH* operonban kódolt. Az enzim a  $\text{NAD}^+$  redukciót végző cianobakteriális [NiFe] hidrogenázok közé tartozik (Rákhely és mts. 2004). Öt alegységes enzim (2. ábra), a hidrogenáz struktúrfehérjéin (Hox1YH) kívül tartalmaz egykét alegységből álló diaforázt (Hox1FU), valamint egy Hox1E alegységet. *In vivo* körülmények között is képes mind a hidrogén oxidációjára, mind a protonok redukciójára a sejt redox állapotának függvényében. A Hox1E alegység deléciója megszünteti a Hox1 hidrogenáz *in vivo* aktivitását, viszont nincs

hatással az *in vitro* aktivitásra, ami arra utal, hogy a Hox1E fehérje szerepe a hidrogenáz felé történő elektrontranszportban van (Rákhely és mts. 2004). A Hox1E alegységre kapcsolt FLAG fúziós partner segítségével a teljes Hox1 komplexet sikerült tisztítani, és mind az öt alegységet azonosítani (Palágyi-Mészáros és mts., 2009).

Ez az öt alegységes felépítés a *T. roseopersicina*-n kívül még a cianobaktériumokban előforduló szolubilis hidrogenázokra jellemző (Vignais és Billoud 2007). Mindeddig egyetlen Hox1- specifikus kisegítő gént találtak, a Hox1W-t, amely a *hox1EFUYH* génektől 3' irányban található (3. ábra) és a nagy alegység proteolitikus hasítását végzi.

### 3.8.2. A SZOLUBILIS HOX2 HIDROGENÁZ

A nemrégiben felfedezett Hox2 hidrogenáz is a  $\text{NAD}^+$  redukáló hidrogenázok csoportjába tartozik. A hidrogenáz kis és nagy alegységét a *hox2H* és *hox2Y* gének kódolják, míg a diaforáz alegységet a *hox2U* és *hox2F* gének. A lokalizációs vizsgálatok valamint a gének *in silico* analízise alapján ez is egy szolubilis enzim. Az enzim aktivitása a sejt egy kései, stacionárius fázisba történő átmenetkor mérhető. Mind az expresszió szintje, mind az aktivitása meglehetősen alacsony (Maróti Judit, személyes közlés).

### 3.8.3. A MEMBRÁN KÖTÖTT HUP HIDROGENÁZ

A *hupSL* gének által kódolt Hup hidrogenáz legfőbb funkciója a sejtekben a légköri hidrogén visszavétele (hydrogen uptake). A Hup hidrogenáz expressziója azonban igen érzékeny az oxigénre, a sejt redox állapotára és kapcsolatban van a Hox1 hidrogenáz expressziójával, a Hox1 enzim deléciójakor a Hup expressziós szintje is jelentősen lecsökken (Palágyi-Mészáros és mts. 2009). Hidrogént bontó aktivitása *in vivo* körülmények között 2g/l tioszulfát koncentrációnál nagyobb, mint a szokásos 4g/l tioszulfát mellett, ekkor ugyanis – feltételezésünk szerint - a sejtmembrán eltérő redox állapotba kerül. A struktúrgénektől 3' irányban található a *hupC* gén (3. ábra), melyről egy b-típusú citokróm fehérje íródik át. A *hupC* deléciója jelentősen csökkenti a Hup hidrogenáz hidrogén visszavevő aktivitását *in vivo* körülmények között, míg a hidrogenáz az *in vitro* aktivitása nem változik. Ezek alapján a HupC-nek az elektron transzportban van szerepe (Palágyi-Mészáros és mts. 2009). A *hupC*-n kívül a

*hup* operonban több olyan kisegítő gén is azonosítható, amelyek szükségesek a Hup hidrogenáz bioszintéziséhez, funkciójához.

#### 3.8.4. REGULÁTOR HIDROGENÁZ

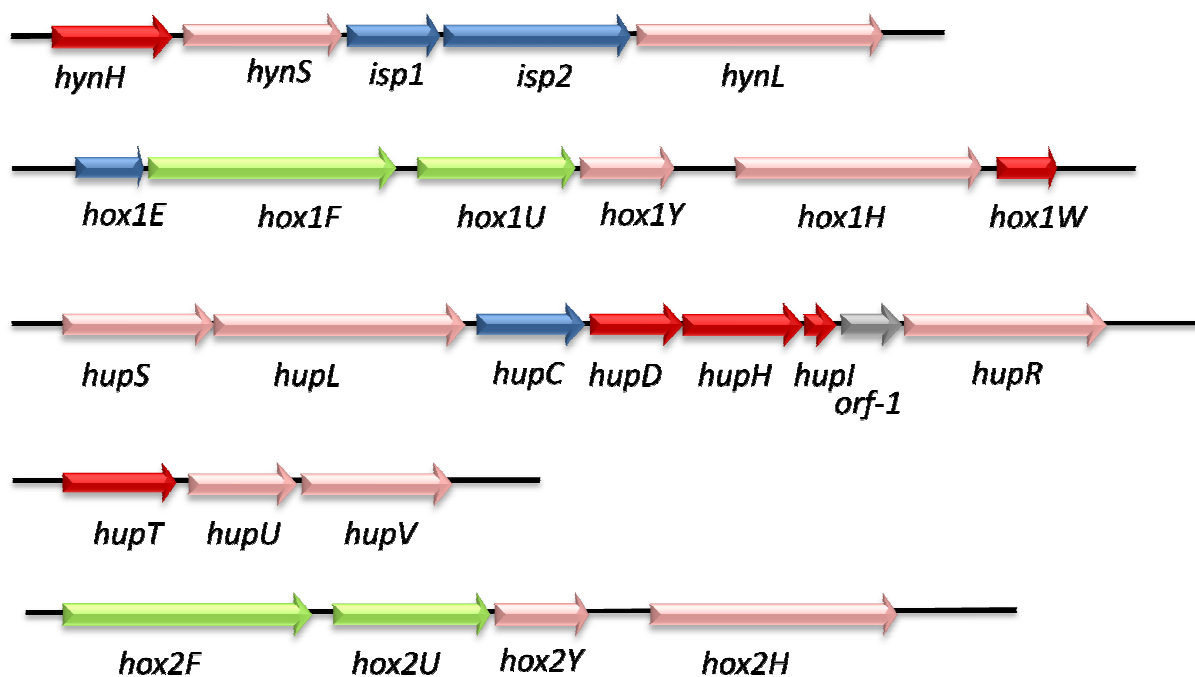
Több, hidrogenázt tartalmazó organizmusban is ismert olyan hidrogenáz, amely képes érzékelni a légkörben található hidrogén mennyiségét (HupUV, HoxBC, HoxRH) (Viganis és mts. 1997, Buhrke és mts. 2004). Az úgynevezett regulátor, vagy szenzor hidrogenáz (*hupUV*) génjei *T. roseopersicina*-ban is megtalálhatóak, valamint a rendszerhez nélkülözhetetlen *hupR* és *hupT* gének is. A *hupT* a *hupUV* gének előtt található, míg a *hupR* a *hupSLCDHIR* operon utolsó tagja. A HupUV szerepe a hidrogén mennyiség érzékelése a légkörben. Ennek ellenére hidrogén-függő reguláció nem tapasztalható egyik hidrogenáz esetében sem a *T. roseopersicina* sejtekben. A jelenség oka, hogy nem képződik mRNS a *hupTUV* génekről, tehát nem keletkezik aktív fehérje sem. Azonban amennyiben plazmidról történik a regulátor hidrogenáz termeltetése, hidrogén- deutérium csere módszerrel kimutatható a hidrogenáz aktivitása, de érdekes módon a hidrogénfüggő szabályozás továbbra sem működik (Kovács és mts. 2003).

#### 3.8.5. HYN HIDROGENÁZ

A Hyn hidrogenáz (régebben Hyd (Rákhely és mts. 1998)) a másik membránkötött hidrogenáz a *T. roseopersicina* sejtekben. Extrém stabilitást mutat hővel, oxigénnel és proteázokkal szemben (Kovács és mts. 1988, Gogotov és mts. 1976), valamint a fotoszintetikus membránból dimer formában tisztítható (Kovács és Bagyinka 1990). Optimális aktivitási hőmérséklete 80°C fölött van annak ellenére, hogy a sejtek 30°C felett már nem képesek szaporodásra. A Hyn hidrogenáz mindezen tulajdonságai miatt ideális alanya lehet a biotechnológiai hasznosításoknak.

A Hyn hidrogenáz a Hup-hoz hasonlóan egy membránkötött enzim (Bagyinka és mts., 1982; Zorin és Linblad, 1993). A Hyn operonban az általános hidrogenáz operon-elrendeződéssel ellentétben a kis és a nagy alegység génje között található két nyitott leolvasási keret (ORF), az *isp1* és *isp2* (3. ábra) (Rákhely és mts. 1998). Hasonló elrendeződés

elvétve található más baktériumokban is a Chromatiaceae családban (pl. *Chromatium vinosum*) (Dahl és mts., 1999; , valamint *Aquifex aeolicus*-ban (Dahl és mts. 1999), *Aquiflex pyrophilus*-ban (Lu és mts. 2001), valamint az Archaeon, *Acidianus ambivalens*-ben (Laska és mts. 2003). Ebben az operonban más kisegítő fehérje génje nem található. A fehérjék homológiát mutatnak a *Desulfovibrio vulgaris hmc* operonjában található (hmc= high molecular weight cytochrome) 5-ös és 6-os ORF-el (Rákhely és mts. 1998), valamint a DsrK és DsrM alegységekkel a disszimilációs szulfid redukáló komplexben (Rákhely és mts. 1998). Az Isp1 transzmembrán régiókat, valamint hem-kötő helyeket tartalmaz. Az Isp2 ezzel ellentétben egy citoplazmatikus fehérje, ami a hetreodiszulfid-reduktázokra hasonlít (Rákhely és mts. 1998).



3. ábra: hidrogenáz operonok *T. roseopersicina*-ban

### 3.9. KÉNANYAGCSERE FOTOTRÓF KÉNBAKTÉRIUMOKBAN

A Chromatiaceae család tagjai nem képesek vízbontásra, ezért az elektronokat a kénvegyületek oxidációjával nyerik.

A különböző kénvegyületek a sejtben elemi kénként alakulnak, amely így elektron

raktárként működik. Az elemi kén képződésére különböző útvonalak ismertek. A tioszulfát oxidációjához például rodanázt (Dahl és mts. 1994) vagy tioszulfát oxidázt (Hensen és mts. 2006) használ a sejt, míg a légköri kénhidrogén oxidációját a szulfid-kinon-reduktáz (SQR) és flavocitokróm-c (FCC) enzimek végzik (Schütz és mts. 1997, Figaard és Dahl, 2009). Az elemi kén a *T. roseopersicina* sejtekben kénglobulusok formájában raktározódik a periplazmatikus térben. *C. vinosum*-ban és *T. roseopersicina*-ban ezeket a globulusokat az SgpABC (Prange és mts. 2004) fehérjék burkolják, melyek funkciójáról nem sokat tudunk.

A kénglobulusokból a kén citoplazmába jutásáról az oxidáció módja nem ismert, az azonban biztosnak látszik, hogy a disszimilációs szulfit-reduktáz (EC 1.13.11.18) szerepet játszik benne. A szulfit szulfiddá való redukcióját a DsrMKJOP komplex végzi (Sander és mts. 2006), amely képes passzív transzportal átjutni a sejtmembránon.

A kénmetabolizmus és a  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  háztartás közötti kapcsolatot a glutation-amid ciklus jelentheti. *Allocromatium gracile*-ben azonosították először a glutation amidot (GASH) és annak két megjelenési alakját, a perszulfid (GASSH) és a diszulfid (GASSAG) formát (Bartsch és mts. 1996). Pott és munkatársai modellje szerint a DsrK fehérje, ami homológ a heterodiszulfid reduktázokkal lehetséges szubsztrátja egy perszulfid formájú vegyület, amelyet a DsrK fehérje elhasít és a DsrM-en keresztül a kinon raktárba juttatja a bontásból származó elektront (Pott és mts. 1998). Ezen hipotézis azonban még nem bizonyított.

### 3.10. A *THIOCAPSA ROSEOPERSICINA* HIDROGÉN- ÉS KÉNANYAGCSERÉJÉNEK FENOMENOLOGIKUS KAPCSOLATA

A különböző kénvegyületek különböző koncentrációja eltérő hatással van a hidrogén anyagcserére. A Hox1 hidrogenáz hidrogéntermelésére pozitívan hat a megnövekedett tioszulfát mennyiség a tápoldatban, azonban csak fényen nevelt kultúra esetén. Sötétben ugyanis a hidrogéntermelőzés minden hidrogenáznál gátlódik (Rákhely és mts. 2007, Laurinavichene és mts. 2007). A különböző kénvegyületek eltérően hatnak a Hup és Hox1 hidrogenáz aktivitására, például a Hup hidrogén visszavevő aktivitása növekvő tioszulfát koncentráció mellett csökken, míg az elemi kén hatására nem változik.

A *Hyn* hidrogenáz eltérően viselkedik a másik két hidrogenáztól, ugyanis magas



kénkoncentráció mellett a Hyn kénhidrogén termelése megnégyszereződik, ami szoros kapcsolatra utal a Hyn hidrogenáz és a kénanyagcsere között (Rákhely és mts. 2007, Laurinavichene és mts. 2007).

A Hox2 esetében a kénanyagcserével való kapcsolatot még nem vizsgáltuk.

A kénanyagcsere, valamint a különböző anyagcsere folyamatok kapcsolatának felderítéséhez, a hidrogenáz bioszintézisben szerepet játszó gének azonosításához elkerülhetetlenné vált a *T. roseopersicina* genomszekvenciájának megismerése.

### **3.11. GENOMSZEKVENÁLÁSI MÓDSZEREK**

Az élőlények genomszekvenálására jelenleg rendelkezésre álló nagy hatékonyságú módszerek igen gyorsan fejlődnek. Dolgozatomban ezek közül elsősorban azokat a módszereket szeretném bemutatni, amelyeket használtunk a *T. roseopersicina* génállományának szekvenálása során.

#### **3.11.1. HIERARCHIKUS SHOTGUN SZEKVENÁLÁS (KLÓNROL KLÓNRA TÖRTÉNŐ SHOTGUN SZEKVENÁLÁS, DIREKT MÓDSZER)**

Ennél a szekvenálási stratégiánál az első lépésként fizikai térképet készítenek az élőlény genetikai állományáról. A fizikai térképezést leggyakrabban restriktív endonukleázokkal, fluoreszcens, vagy radioaktív jelölés segítségével végzik (Brown 2002). Ezután egy olyan genomi könyvtárat készítenek, amelynél a vektorok 2-300 kilobázisnyi inszerteket tartalmaznak (5. ábra). Ez utóbbi könyvtár készítéséhez leggyakrabban BAC, lambda, cosmid vagy fosmid vektorokat használnak.

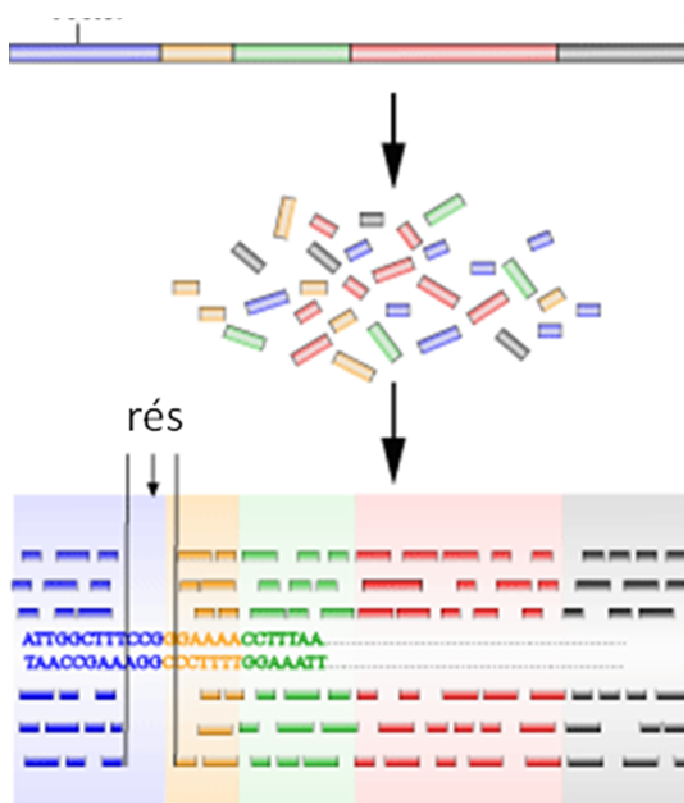
Miután ez elkészült, az egyes klónokban olyan referencia pontokat (markereket) keresnek, amely alapján később a szekvenciák összeállítása könnyebb lesz. Ilyen „jelzőhelyek” lehetnek bizonyos restriktív enzimek hasítóhelyei, vagy más, ismert szekvenciaelemek. A könyvtár klónjaiból kiválogatják azokat, amelyek nem tartalmaznak nagy átfedő régiókat, ugyanis ezek szekvenálása fölösleges pluszkiadást jelentene. Az összehasonlítást általában

DNS fingerprint módszerrel végzik (Green, 2001).

A kiválasztott klónokban található inszertet ezután –általában valamilyen fizikai módszerrel- néhány kilobázisnyi darabokra törik, darabjait pedig plazmid vektorba szubklónozzák, és ezeket kétoldalról szekvenálják.

### 3.11.2. A TELJES GENOM SHOTGUN MÓDSZERREL VALÓ SZEKVENÁLÁSA

Ennél a módszernél a genomális DNS-t mindjárt kisméretű darabokra tördelik össze (4. ábra), majd a darabokat plazmid vektorba klónozzák. A nagy mennyiségű szubklónokat mindkét irányból megszekvenálják, majd a szekvenciák utókezelése (bizonytalanul olvasható és a vektoriális régiók eltávolítása) után a darabokat kontigokba és szuperkontigokba illesztik (Green, 2001). Először 1995-ben bizonyították a skeptikus tudósoknak, hogy ezzel a módszerrel meg lehet állapítani egy élőlény teljes bázissorozatát, ekkor készült el ugyanis a *Haemophilus influenzae* nevű baktérium teljes genomszekvenciája (Fleischmann és mts., 1995).



4. ábra: a shotgun szekvenálás elve

A módszernél a legfontosabb követelmény, hogy a megszekvenált darabok hossza

olyan nagy legyen, hogy többszörösen (8-10×) lefedjék a teljes genomot, mert az összeillesztés csak ebben az esetben lehetséges.

Leginkább baktériumoknál alkalmazzák, ezek DNS-e ugyanis sokkal kisebb, mint az eukariótáké, és kevesebb ismétlődő szekvenciát tartalmaznak. Eukariótáknál esetén inkább a hierarchikus shotgun módszer terjedt el, így készült el például a *Drosophila melanogaster* genom szekvenciája is (Adams és mts., 2000).

Meg kell jegyezni, hogy csak shotgun alapú megközelítést alkalmazva nem nagyon lehet teljes genomot összerakni, további kiegészítő kísérletek szükségesek (ld. 26. oldaltól).

### 3.11.3. HIBRID KÖNYVTÁR KÉSZÍTÉS

A már befejeződött genom projektek tapasztalatai azt mutatják, hogy a legcélravezetőbb az, ha az élőlény genetikai állományáról kis inszerteket tartalmazó, valamint nagy inszerteket tartalmazó könyvtárt is készítenek (Fleischmann és mts. 1995).

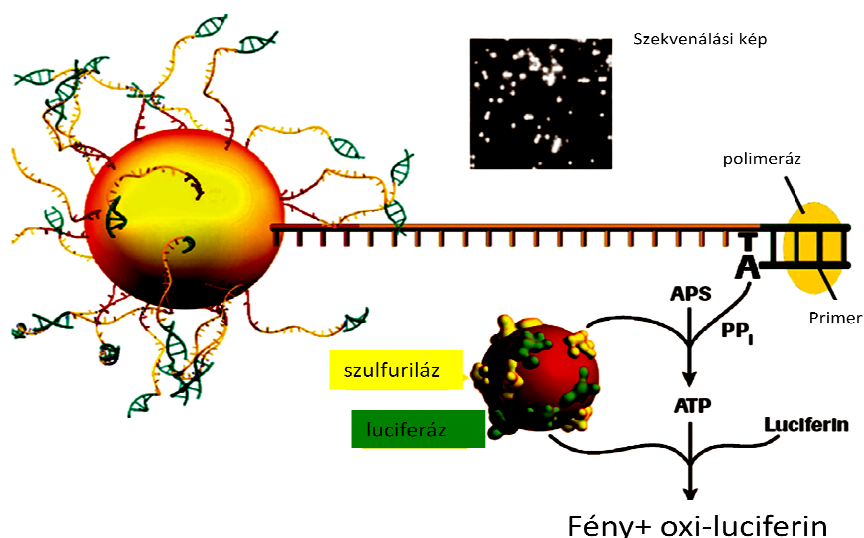
A plazmid könyvtárnál fontos követelmény, hogy minél több megszekvenált klón álljon rendelkezésre, hogy az összeállítás könnyebb legyen. A nagy genomiális darabokat tartalmazó klónok szerepe leginkább a végső összeállítás fázisában nagy, ugyanis segítségükkel történik a kontigok genom vázzá ("scaffold"-okká) való rendezése. Az így vázba rendezett kontigok közötti lyukak már PCR termékekkel átívelhetőek és ezek szekvencia analízisével a genom egy összefüggő szekvenciába rendezhető (Franguel és mts., 1999).

### 3.11.4. PRIMER SÉTA

A primer séta lényege, hogy készítenek egy nagy méretű inszerteket tartalmazó könyvtárat, majd a klónokat mind a két oldaláról szisztematikusan szekvenálják. Első körben a vektorhoz tartalmazó primereket használják, majd a következő lépésekben mindig az előző kísérletből származó szekvencia alapján terveznek új primereket. Ezt addig folytatják, amíg a két végről kapott kontigok össze nem érnek. Az így kapott nagy klónok szekvenciáját, pl. nagy áteresztőképességű kromoszómális sétával lehet összepasszintani. A módszer nagyon lassú, költséges és munkaigényes.

### 3.11.5. 454 SZEKVENÁLÁS (PIROSZEKVENÁLÁS)

A 454 szekvenálás során a genomi DNS-nek 100 bázisnyi szakaszait szekvenálják. A kis egységekre feldarabolt genomot két végén primer/jelölő/immobilizáló részekkel látják el, majd minden darabot egyedileg egyszálú DNS formában hordozóhoz (mikrogyöngyhöz) kötnek. A gyöngyöket emulziós mikrokörnyezetbe zárják, majd klonálisan amplifikálják. Az így megsokszorozott, hordozóhoz kötött genomi DNS darabok több millió kópiát tartalmaz ugyanabból a rövid DNS szakaszból, egy lemezen pedig több százezer olyan lyuk helyezkedik el, melybe egyetlen mikrogyöngy fér bele. Minden egyes lyukba elvben más gyöngy kerül és a lyukakban egymással párhuzamosan több százezer reakció hajtható végre. A nukleotidok megfelelő sorrendben érintkeznek a lyukakban található, gyöngyökhöz immobilizált DNS szálakkal.



5. ábra: a 454 piroszekvenálás elve

Amikor szekvenálandó szálon a következő nukleotiddal komplementer bázissal található, akkor az a bázis beépül a komplementer szálba. Ez a jelenség egy pirofoszfát lehasadásával jár, melyet egy szulfuriláz illetve luciferáz enzimek segítségével fényjelenség formájában tudunk detektálni. Így minden korrekt nukleotid beépülését fényjelenség kíséri, melyet egy CCD kamera érzékel. A be nem épült nukleotidot egy nukleotidáz enzim lebontja, mielőtt a következő nukleotidok hozzáadnánk. Az így kapott jeleket informatikai eszközökkel szekvenciává illetve kontigokká konvertálják.

### 3.11.6. BIOINFORMATIKA

#### 3.11.6.1. A szekvenciák összeillesztése

A kapott szekvenciák összeállításában már sokféle szoftver és módszer áll a rendelkezésre. A genomika ezen része, amely már az adatok feldolgozásával foglalkozik a bioinformatika egyik igen fontos területét jelenti.

Ennek a munkának három fázisa van:

1. *az automata szekvenátorok által kiadott adatok alapján a pontos nukleotid sorrend megállapítása*

Erre a lépésre azért van szükség, mert az automata szekvenátorok által kiadott szekvencia időnként tartalmazhat hibákat, vagy olyan bázisokat, ahol a gép nem tudta pontosan eldönteni, hogy milyen nukleinsavról van szó. A munkában nagyfokú segítséget nyújtanak a különböző szoftverek (pl. Getlanes, Geilmager, BaseFinder, Phred), amelyek gyorsan és megbízhatóan állapítják meg a szekvenciát.

2. *az átfedő szekvenciák összeillesztése (kontigok létrehozása)*

Az összeillesztés hatékonysága nagyban függ attól, hogy hány klón szekvenciája áll rendelkezésre, valamint hogy a leolvasott szekvencia milyen hosszúságú és minőségű. A leggyakrabban használt programok ebben a lépésben a TIGR-Assembler, a Phrap és a CAP2.

A kontigok olyan átfedő klónok, amelyek egy folyamatos sorba illeszthetők a genom szekvenálás ezen fázisában. A kontigok várható száma statisztikailag megállapítható, várhatóan egyenlő lesz azon szakaszok számával, amelyekről nem kapunk adatot (Fraser és Fleischmann. 1997).

### **3. a kontigok összeillesztése (szuperkontigok)**

Ebben a lépésben fontos szerepet kaphatnak a nagy inszertet tartalmazó klónok. Az összeillesztésnek különböző módszerei vannak.

Az összeillesztésben az ember is fontos szerepet kap, ugyanis gyakran a leolvasási és összeillesztési hibák okozzák, hogy két szomszédos kontig összeillesztését a használt szoftver nem tudja elvégezni.

### **4. Záró fázis:**

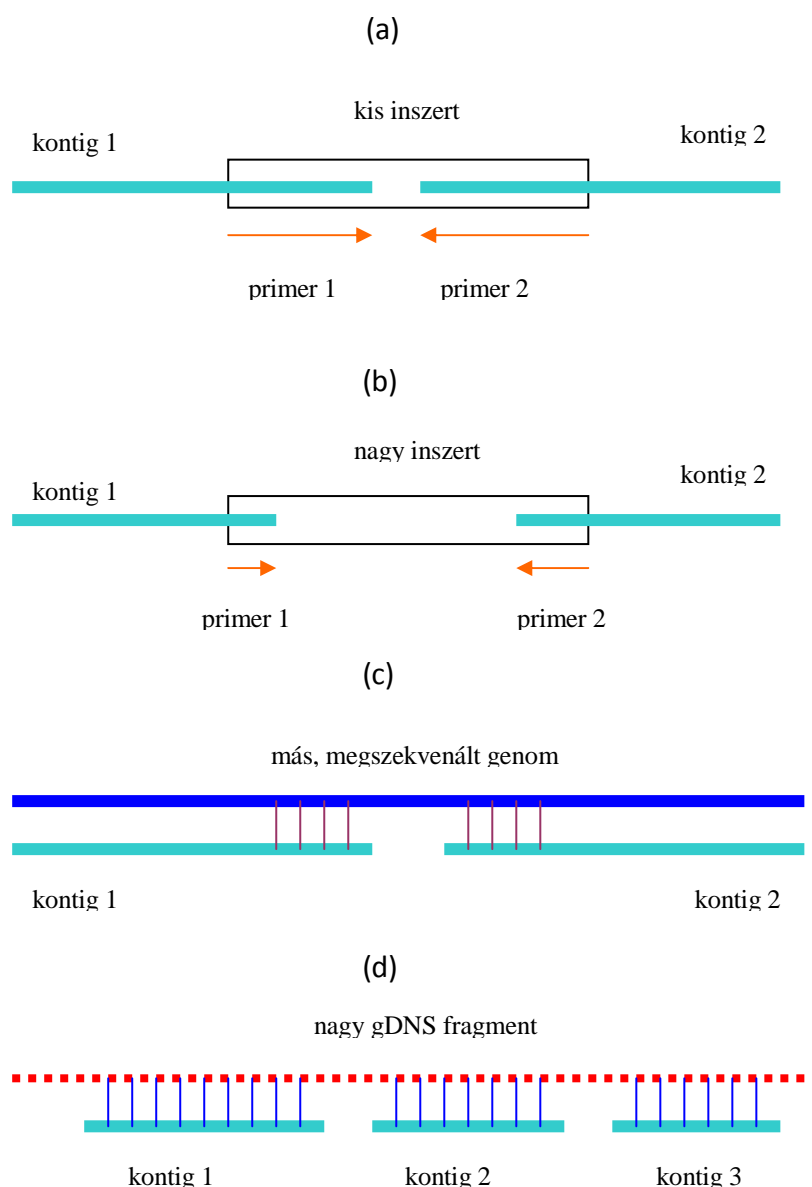
A kontigok közti nem ismert szakaszok szekvenciájának megállapítása PCR termék, vagy valamelyik klónozott szakasz segítségével. Ebben a lépésben is sokat segíthetnek a nagy inszerteket tartalmazó könyvtár klónjai. Legjobb esetben egyetlen nagy kontig a végeredmény.

#### **3.11.6.2. Annotálás**

*A kódoló és nem kódoló régiók elkülönítése, a gének helyzetének megállapítása:*

Ezért ennek a szakasznak az első lépése a nyitott leolvasási keretek (Open Reading Frame) megkeresése. Általában funkcionális régiókat, pl. potenciális kódoló szakaszokat, transzkripció és transzláció elemeket, exon-intron határokat keresnek és ebből automatizált eljárás generál egy annotált genomot.

A homológia alapján való keresés azonban még nem bizonyíték az adott gén, illetve az arról átíródó fehérje szerepére. Főleg az automatizált eljárások adhatnak félrevezető eredményeket. Amennyiben igényesen analizált genomra van szükségünk, az automatikusan annotált genomot manuálisan leellenőrzi. Ezt a folyamatot, mely dominánsan biokémiai és metabolikus ismereteket igényel, angolul curation-nak nevezik. Igazán megbízható eredményt csak a kísérletes módszerek adnak.



**6. ábra: módszerek a kontigok összeillesztésére:**

(a) egy klón segítségével a kis inszerteket tartalmazó könyvtárból (b) egy klónnal a nagy inszerteket tartalmazó könyvtárból (c) egy más, megszekvenált genom segítségével (d) egy nagyobb fragmenthez való hibridizálással (Franguel és mts. 1999).

#### 4. CÉLKITÚZÉSEK

A *Thiocapsa roseopersicina* öt, különböző típusú hidrogenáz enzimet tartalmaz, melyek közül az élő sejtekben négy aktív enzim van. Ezzel a „hidrogenáz bőséggel” a *T. roseopersicina* sejtek egyediek az élővilágban. A különböző hidrogenázok szerepéről a *T. roseopersicina* sejtekben jelenleg nem sokat tudunk, csoportunk munkahipotézise szerint a különböző hidrogenázokra különböző körülmények között illetve különböző metabolikus kontextusban van szükség attól függően, hogy a sejt milyen környezetbe kerül vagy milyen anyagcsereúttal áll kapcsolatban. A hidrogenázok felépítésének, pontos funkciójának és működésének, valamint az enzimek kapcsolatának vizsgálata a különböző sejten belüli anyagcsere folyamatokhoz mind-mind egyre közelebb visz minket az ipari léptékű biológiai hidrogén termelés megvalósulásához.

A *T. roseopersicina*-ban található *Hyn* hidrogenáz különlegessége, hogy a többi hidrogenáz enzimtől eltérően igen nagyfokú stabilitást mutat, valamint hogy operonjában a gének elrendeződése nem megszokott, a kis és a nagy alegységet kódoló régiók között található két nyitott leolvasási keret, melyek szerepét nem ismerjük.

Munkám során legfőbb célom volt, hogy

- megvizsgáljam a *hyn* hidrogenázt kódoló lókuszban előforduló géneket,
- megállapítsam, mely géntermékek vesznek részt a *Hyn* hidrogenáz felépítésében,
- jellemezzem az intergenikus régiókról átíródó fehérjék szerepét,
- valamint megállapítsam, hogyan illeszkedik a *Hyn* hidrogenáz a *T. roseopersicina* metabolikus folyamataiba, a kapcsolatban szerepet játszó géneket megkeressem a *T. roseopersicina* genomjában.



## 5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 5.1. BAKTÉRIUM TÖRZSEK ÉS PLAZMIDOK

#### 5.1.1. *E. COLI* TÖRZSEK

XL-1 Blue MRF'	<i>recA1 gyrA96 (F' lac<sup>q</sup> Z) Tc<sup>r</sup></i>	Stratagene
BL21(DE3)	<i>hsdS gal (λ clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i>	Novagen
Top10	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Invitrogen
S17-1 λ pir	294 ( <i>recA pro res mod</i> ) <i>Tp<sup>r</sup> Sm<sup>r</sup> (pRP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7)</i>	Herrero és mts., 1990
EPI100-T1 <sub>R</sub>	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80d lacZDM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK l- rpsL nupG</i>	Epicentre

#### 5.1.2. *T. ROSEOPERSICINA* TÖRZSEK

BBS	Vad típus	Bogorov, 1974
GB2131	<i>ΔhupSL, ΔhoxH</i>	Rákhely és mts. 2004
M539	a <i>hypF</i> gén mutáltatva <i>T. roseopersicina</i> BBS-ben	Fodor és mts. 2001
pTHOE5M/GB112131	pTHOE5M plazmid a <i>ΔhynSL, ΔhupSL, ΔhoxH</i> törzsben	ez a munka
GB112131	<i>ΔhynS-isp1-isp2-hynL, ΔhupSL, ΔhoxH</i> törzs	Rákhely és mts. 2004
ISP1M	<i>ΔhupSL, ΔhoxH, Δisp1</i> törzs	ez a munka
ISP12M	<i>ΔhupSL, ΔhoxH, Δisp1,2</i> törzs	ez a munka

**Isp2 pontmutáns *T. roseopersicina* törzsek:** Minden esetben a genotípus megegyezik a pTHOE5M/GB112131 törzs genotípusával, amelyben az egyik aminosavat pontmutációval egy másik aminosavra cseréltem.

törzs neve	amivosav csere
ISP2M140	p140 GB112131-ben N140G

ISP2M164	p164 GB112131-ben	G164A
ISP2M229	p229 GB112131-ben	T229A
ISP2M239	p239 GB112131-ben	N239I
ISP2M276	p276 GB112131-ben	H276L
ISP2M286	p286 GB112131-ben	P286A
ISP2M299	p299 GB112131-ben	H299A
ISP2M327	p327 GB112131-ben	D327A
ISP2M333	p333 GB112131-ben	R333G
ISP2M342	p342 GB112131-ben	R342A
ISP2M404	p404 GB112131-ben	C404R
ISP2MCL1	pCL1 GB112131-ben	Q273A C274G G275R H276L
ISP2MCL2	pCL2 GB112131-ben	H326L D327A C329G R333G
ISP2MCL3	pCL3 GB112131-ben	C364A C365A G368A G370A

### 5.1.3. PLAZMIDOK

pBluescript SK +/-	ColE1 Amp <sup>r</sup>	Stratagene
pK18mobSacB	ColE1, <i>sacB</i> , Km <sup>r</sup> szűk gazdasepcifitású integrálódó vector	Schafer és mts. 1994.
pUNSBamHI	az <i>isp1</i> gén "upstream" régiója pUC19- ben	Ez a munka

pMHE6crtKm	pBBR alapú expressziós vektor, amely N-terminális FLAGII és Strep fúziós partnereket tartalmaz	Fodor és mts. 2004.
pUS2	az <i>isp1,2</i> gének downstream és upstream homológ régiója pUC19-ben	Ez a munka
pET-15b	<i>lacI</i> , Ap, pBR32 ori, His-tag	Novagen
pBIS2	az <i>isp2</i> gén pBluescript SK+ vektorban	Ez a munka
pAT-Isp2	az <i>isp2</i> gén pET15b vektorban	Ez a munka
pISP12M	az <i>isp1,2</i> gének downstream és upstream homológ régiója in frame pK18mobSacB-ben	Ez a munka
pUS3	az <i>isp1</i> gén upstream és downstream homológ régiója pUC19-ben	Ez a munka
pISM1/3	az <i>isp1</i> gén upstream és downstream homológ régiója pK18mobSacB-ben	Ez a munka
pTSH2/8	pBluescript vektorban a <i>hynS-isp1-isp2</i> gének, valamint 257 bázis a <i>hynL</i> elejéből	Rákhely és mts., 1998.
pTSH51/1	pDSK509 vektorban a <i>hynS-isp1-isp2</i> gének, valamint csonka <i>hynL</i> gén	Ez a munka
pTHOE5M	a <i>hynS-isp1-isp2-hynL</i> operon pDSK509 vektorban	Ez a munka
pTHOE51M	a <i>hynS-hynL</i> gének pDSK509 vektorban	Ez a munka
pBtHynLApal	a pTHOE5M vektor <i>Apal</i> emésztett darabja pBluescript SK+-ben, tartalmazza az <i>isp2-hynL</i> géneket	Ez a munka
pHE12	pMHE6crtKm-ben az <i>isp1-2</i> gének	Ez a munka
pKIST4	pDSK509 vektorban az <i>isp1-2</i> gének	Ez a munka

#### 5.1.3.1. Az Isp2 fehérje pontmutációjához használt plazmidok

p140	pTHOE5M-ben a pApa-140 <i>Apal</i> fragmentje
p164	pTHOE5M-ben a pApa-164 <i>Apal</i> fragmentje
p227	pTHOE5M-ben a pApa-227 <i>Apal</i> fragmentje
p229	pTHOE5M-ben a pApa-229 <i>Apal</i> fragmentje
p239	pTHOE5M-ben a pApa-239 <i>Apal</i> fragmentje
p276	pTHOE5M-ben a pApa-276 <i>Apal</i> fragmentje
p286	pTHOE5M-ben a pApa-286 <i>Apal</i> fragmentje
p299	pTHOE5M-ben a pApa-299 <i>Apal</i> fragmentje
p327	pTHOE5M-ben a pApa-327 <i>Apal</i> fragmentje
p333	pTHOE5M-ben a pApa-333 <i>Apal</i> fragmentje
p342	pTHOE5M-ben a pApa-342 <i>Apal</i> fragmentje
p404	pTHOE5M-ben a pApa-404 <i>Apal</i> fragmentje

pCL1	pTHOE5M-ben a pApa-CL1 <i>Apal</i> fragmentje
pCL2	pTHOE5M-ben a pApa-CL2 <i>Apal</i> fragmentje
pCL3	pTHOE5M-ben a pApa-CL3 <i>Apal</i> fragmentje

#### 5.1.4. PRIMEREK

Név	Szekvencia (5' → 3')
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC
-20	GTAAAACGACGGCCAGT
otsh5r	GGCTGCTCCGAGCCGAG
otsh7	CGGCGTTGGTCGCCTCG
otsh8	AGCTGTAGGCTTGGGCG
otsh11	CTGCCCCGAGCTTGACGC
otsh14	GATCGCGATATTGAACATC
otsh15	CTGACGCACATCTTCACGA
otsh16	TGCGAGCGGTCTGACTGAAGA
trhydo3	CATATGGCTGCCCCGTAACCCCACTGAT
trhydo4	TCAAGGACCGCAAGATCGCC
isp1o1	CATATGAGCGGCTCGATGGAG
isp1o5	TGACTGAACCCCTTACGGC
isp1o7	TCGCACGCTGGTACAACGGG
isp2o1	CATATGAGCGAGCTGACACTTG
isp2o2	ACCAGGTGCTCGGCGATCAT
isp1o8	AGCTGACGCACATCTTCACG
isp2o7	GGTGAGACCGACCACCGGGA

#### 5.1.4.1. Isp2 pontmutációhoz használt primerek

140m1	CCGCAAATCAGGCGAAGGCATG
140m2	CATGCCTTCGCCTGATTTGCGG
164m1	ATCCAGACCGCCAGCCCCATGG
164m2	CCATGGGGCTGGCGGTCTGGAT
229m1	CGGTCGAGAGCGCCCAGGTCAC
229m2	GTGACCTGGGCGCTCTCGACCG
239m1	GAGGCGACCAACGCCGGCATCC
239m2	GGATGCCGGCGTTGGTCGCCTC
276m1	GAGTGCGGACTCGCCTTTACGG
276m2	CCGTAAAGGCGAGTCCGCACTC
286m1	TTGGGAAGGCGCGAACCTGATCG
286m2	CGATCAGGTTGCGCCTTCCCAA
299m1	CAAGGTCTTCGCCATCATCGAGG
299m2	CCTCGATGATGGCGAAGACCTTG
327m1	CTCGATGCACGCCCCGTGCAACC
327m2	GGTTGCACGGGGCGTGCATCGAG
333m1	ACCTGGCCGGCAAGAGCGGTGT
333m2	ACACCGCTCTTGCCGGCCAGGT
342m1	TCCAGCAGCAGGCCAACCTCATGG
342m2	CCATGAGGTTGGCCTGCTGCTGGA
404m1	TGGTCACCATGGGCGCCACCTG
404m2	CAGGTGGCGCCCATGGTGACCA
ocl1m3	ATCAGTCCCGCGGGCGGACACGCCTT
ocl1m4	AAGGCGTGTCCGCCCCGCGGGACTGAT
ocl1m5	AGTCCCGCGGGCGCACTCGCCTTTA
ocl1m6	TAAAGGCGAGTGCGCCCCGCGGGACT
ocl2m1	TCTCGATGCTCGCCCCGGGCAACCTGGCCGGCAAGAGCGG

ocl2m2	CCGCTCTTGCCGGCCAGGTTGCCCCGGGGCGAGCATCGAGA
ocl3m3	TCCAGTGGGGTGGCGGTGCCGGCG
ocl3m4	CGCCGGCACC GCCACCCCACTGGA
ocl3m5	GCCGCCGGGGCTGTCAGCTCCAACG
ocl3m6	CGTTGGAGCTGACAGCCCCGGCGGC

## 5.2. OLDATOK

**TE puffer:** Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM (pH=8,0)

**TAE:** 4mM Tris-acetát, 1mM EDTA

**LB:** 1000 ml tápoldathoz 10g tripton, 5g élesztő kivonat, 10g NaCl

**SOB:** 1000 ml tápoldathoz 20g tripton, 5g élesztő kivonat, 0.5g NaCl

**PC** (Pfennig-féle tápoldat): 1 literre: 20g NaCl, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g MgCl<sub>2</sub>, 1g KCl, 1g NH<sub>4</sub>Cl, 2g NaHCO<sub>3</sub>, 2g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 200ml (I B<sub>12</sub> vitamin (100mg/ml), 1ml 20 mM Fe-EDTA, 1ml mikroelem oldat (Pfennig és Trüpper, 1991)

**Mikroelem oldat:** 2975mg Na<sub>2</sub>-EDTA, 300mg H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 200mg CaCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O, 100mg ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 30mg MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 30mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 20mg NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 10mg CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1000ml vízben

## 5.3. BAKTÉRIUMOK TENYÉSZTÉSE

A *T. roseopersicina* törzseket 25-28°C-on folyamatos megvilágítás mellett, csiszolt dugós üvegekben, Pfennig féle tápoldatban növesztettem 3-4 napig . Az aktivitás mérésekhez leoltott sejteket 5µM-os végkoncentrációra kiegészített NiCl<sub>2</sub>-ot tartalmazó PC tápoldatban növesztettem teljesen anaerob körülmények között.

## 5.4. RNS-EL VÉGZETT MUNKÁK

### 5.4.1. RNS IZOLÁLÁS

Az RNS izoláláshoz a *T. roseopersicina* sejteket anaerob körülmények között növesztettem fel. OD<sub>600</sub>=1-1,5 érték elérését követően a sejteket centrifugáltam (13000 rpm, 2 perc). A csapadékot ezután 300 µl SET pufferben (20 % szukróz, 50 mM EDTA (pH 8,0), 50 mM TrisHCl

(pH=8,0)) szuszpendáltam fel, majd 300 µl SDS puffert (20 % SDS, 1 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 4,8) adtam hozzá. Az elegyet óvatosan fel-le forgatva az eppendorf csövet homogenizáltam, majd 500 µl telített NaCl oldatot adtam hozzá. Ezt követően a mintát 13000 rpm-en 10 percig centrifugáltam, majd a tiszta felülúszót előkészített Eppendorf csőbe pipettáztam át. Az RNS-t a minta térfogat 0,7-szeresének megfelelő mennyiségű izopropanolal csaptam ki, majd 20 percen át 13000 rpm-en centrifugáltam. A felülúszó leöntését követően a csapadékot 1 ml 70 %-os alkohollal mostam, majd 2 percen át 13000 rpm-en centrifugáltam. A felülúszó leszívását követően az RNS-t szárítottam, majd 20 µl vízben (DEPC kezelt) vettem fel.

#### **5.4.2. DNÁZ I KEZELÉS**

Az RNS mintákat 1x DNáz I pufferben 1U enzim/µg RNS mennyiségű DNáz I (Fermentas) jelenlétében 60 percig inkubáltam 37 °C-on. Az RNS-t azonos térfogatú fenol-kloroform 1:1 arányú elegyével extraháltam, majd a felső, vizes fázisból izopropanollal csaptam ki. A csapadékot 70 %-os etanollal mostam, majd szárítást követően DEPC kezelt vízben vettem fel.

#### **5.4.3. REVERZ TRANSZKRIPCIO**

A kísérletben RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) enzimet használtam a gyártó cég útmutatásainak megfelelően, 1 µg DNáz I kezelt RNS-t használva templátként. Az RNS-t 20 pmol primer jelenlétében 70 °C-on inkubáltam 5 percig, majd jégen lehűtöttem. Ezt követően 8 mmol végkoncentrációnak megfelelő dNTP-t, valamint 2µl 10x MMLV (Fermentas) puffert adtam az elegyhez, majd megfelelő mennyiségű víz hozzáadásával 20 µl végtérfogatot alakítottam ki. A reakcióelegyet 200U MMLV (Fermentas) és 20U ribonukleáz inhibitor (Fermentas) mellett inkubáltam 1 órán át 42°C-on.

### **5.5. DNS MANIPULÁCIÓK**

#### **5.5.1. GENOMI DNS IZOLÁLÁS *T. ROSEOPERSICINA*-BÓL**

Genomi DNS tisztításához "Gene Elute" (Sigma) genomi DNS tisztító kitet használtam (KT2110-KT1). Ehhez 6 ml kultúrát centrifugáltam, a sejteket felszuszpendáltam 200 µl lízis oldatban, 20 µl RnázA hozzáadása után 2 percig szobahőn inkubáltam, majd hozzáadtam 20 µl

proteináz K-t és az elegyet inkubáltam 30 percig 55 °C –on inkubáltam. Ezt követően - 200 µl „C” lízis oldat hozzáadása után - 10 percig 55 °C-on tartottam az elegyet. A sejtlizátumot - 500 µl kolonna preparáló oldattal való átmosás után - rámértem az oszlopra. Átmostam a mátrixot 500 µl “mosó oldat 1”-el, majd 500 µl ugyanezzel a mosó oldattal megismételtem a mosást. Az oldatokat további centrifugálásokkal teljesen eltávolítottam az oszlopról. A genomi DNS-t 200 µl eluáló oldattal mostam le az oszlopról.

#### **5.5.2. PLAZMID DNS TISZTÍTÁSA *E. COLI*-BÓL**

A plazmid izoláláshoz 5 ml antibiotikum tartalmú LB tápoldatbabe oltottam le egy telepet a meghatározott baktérium törzsből. A sejteket egész éjszakán át 37°C-on rázatva növesztettem. Másnap ebből a tenyészetből a Sigma plazmid izoláló rendszerével tisztítottam DNS-t (Sigma Kat. szám: PLN350). A tenyészetet 1,5 ml-es centrifugacsőben centrifugáltam (12000 rpm 5 perc). A sejteket 200µl Puffer P1-ben (50mM Tris-HCl, pH=8; 10mM EDTA; 100µg RNáz A) szuszpendáltam fel, majd 200µl Puffer P2-t (200mM NaOH; 1% SDS) adtam hozzá, és keverés után 5 percig inkubáltam szobahőmérsékleten. Ezt követően 350 µl Puffer P3 -t (3M K-acetát, pH= 5,5) adtam hozzá, és 10 percig jégen tartottam, majd centrifugáltam (13200 rpm, 10 perc, 4 °C). A DNS tisztító oszlopra 500 µl előkészítő oldatot vittem fel, centrifugáltam, majd a sejtlizátumot vittem fel az oszlopra. Centrifugálás után a nem specifikusan kötődő anyagokat 750 µl mosó pufferrel lemostam, majd a teljesen kiszáritott oszlopra 50µl desztillált vizet tettem. Pár perc várakozás után tiszta eppendorfbba centrifugáltam a tisztított DNS-t.

#### **5.5.3. AGARÓZ GÉLELEKTROFORÉZIS**

Az analitikai és preparatív célokból végzett gélelektroforézisekhez 0,8 - 2%-os, 0,5 µg/ml EtBr-ot tartalmazó agaróz gélét használtam 1xTAE pufferben, 70-90 V futtatási feszültséggel.

#### **5.5.4. FRAGMENT IZOLÁLÁS**

Preparatív agaróz gélelektroforézis után a gélből a kívánt DNS fragmentet steril



pengével vágtam ki, és 1,5 ml-es centrifugacsőbe helyeztem. A DNS izolálását a gélből a Fermentas DNS extrakciós kitjével (Fermentas, Kat. szám: KO513) végeztem el. 200 µl térfogatú géldarabhoz háromszoros mennyiségű NaI oldatot adtam és az agaróz oldódásáig 55°C-on rázattam. 5µl szilikaport adtam az oldathoz és 5 percig 55°C-on inkubáltam, gyakran keverve. 2 perces centrifugálás (13500 rpm) után a mátrixot átmostam 500µl mosó pufferrel, majd 1 percig centrifugáltam 13500 rpm-en. A mosást még kétszer megismételtem, majd az utolsó centrifugálás után a szilikagélt levegőn szárítottam 10 percig. Ezután a szilikaporra 10 µl desztillált vizet raktam és 55°C-on inkubáltam 5 percig, gyakran vortexelve, majd centrifugáltam 2 percig 13500 rpm-en. A felülúszót másik centrifugacsőbe vittem át. Az elúciós folyamatot még egyszer megismételtem, a felülúszókat egyesítettem.

#### **5.5.5. EMÉSZTÉSEK RESTRIKCIÓS ENZIMEKKEL**

A restrikciós emésztéseket Fermentas enzimekkel végeztem, az enzimek saját, gyári pufferében a cég instrukciói alapján.

#### **5.5.6. DNS VÉGEK TOMPÍTÁSA T4-POLIMERÁZZAL ÉS KLENOW-POLIMERÁZZAL**

A 3' túlnyúló végek eltávolításához a DNS-t Fermentas T4 polimeráz enzimmal, T4 polimeráz 1x pufferben, 0,2 mM dNTP-t jelenlétében 14 °C-on 30 percen át inkubáltam. Az 5' túnyúló végeket Fermentas T4 polimerázzal, saját pufferben, 0,2mM dNTP mellett szobahőmérsékleten, 5 perces reakcióval töltöttem fel.

#### **5.5.7. POLINUKLEOTID KINÁZ KEZELÉS**

A DNS molekulák 5' végi foszforilálását Fermentas polinukleotid kinázzal végeztem, 1x polinukleotid kináz puffer A-ban, 5-10mM rATP mellett, 30 perc 37°C-os inkubálással. Az enzimet 10 percig, 75°C-on hőinaktiváltam.

#### **5.5.8. LIGÁLÁS**

A beépítendő DNS fragmentumot 2-5-szeres feleslegben adtam a vektorhoz. 2U Fermentas T4 DNS-ligáz enzimet alkalmaztam 1x T4 DNS-ligáz pufferben szobahőmérsékleten 2-16 órán át végezve a reakciót.

#### **5.5.9. KÉMIAI KOMPETENS SEJT KÉSZÍTÉS**

Az XL-1 Blue MRF', BL21 (DE3) és S17-1 sejteket 50ml SOB-ban, 22°C-on  $OD_{600nm}=0,4-0,6$ -ig növesztettem, 10 percig jégen inkubáltam, majd centrifugáltam 2500g-n 4°C-on 10 percig. Az összegyűlt sejteket jégen tartva 16ml TB pufferben szuszpendáltam fel, majd a fentiekhez hasonlóan centrifugáltam. A sejteket 4ml TB pufferbe vettem fel, ehhez 300  $\mu$ l DMSO-t adtam és 10 percig jégen inkubáltam, majd 100 $\mu$ l-enként előre lehűtött eppendorf csövekbe szétosztva, folyékony N<sub>2</sub>-ben való fagyasztás után -80 °C-on tároltam felhasználásig (Inoue és mts., 1990).

#### **5.5.10. KÉMIAI TRANSZFORMÁLÁS**

A transzformálandó DNS-t 100 $\mu$ l jégen felolvasztott *E. coli* XL1-Blue MRF', illetve S17-1  $\lambda$ pir kompetens sejtekhez adtam, melyeket ezután 15 percig jégen tartottam. A hősokkot követően (42°C, 45 mp) a sejtekhez 900 $\mu$ l SOB-ot adtam, 1 órát 37°C-on rázattam, végül a megfelelő antibiotikummal kiegészített LB lemezre szélesztettem.

#### **5.5.11. ELEKTROKOMPETENS SEJT KÉSZÍTÉS**

A TOP10 kompetens sejteket LB médiumban 37°C-on  $OD_{600nm}=0,4-0,5$ -ig növesztettem, majd 10 percig jégen tartottam. A sejteket 4000 $\times$ g-n, 4°C-on, 15 percig centrifugáltam, majd 200ml jéghideg desztillált vízben oldottam fel őket. Ezután megint lecentrifugáltam a sejteket, majd a fenti mosási lépést még egyszer elvégeztem. A sejteket 20%-os hideg glicerolban oldottam fel, majd centrifugálás után 3 ml 10%-os glicerolban. A sejteket 50 $\mu$ l-enként eppendorfbokba osztottam, folyékony N<sub>2</sub>-ben lefagyasztottam, és felhasználásig -70°C-on tároltam.

#### **5.5.12. ELEKTROPORÁLÁS**

A transzformálandó DNS-t 50 $\mu$ l TOP10 elektrokompetens sejthez adtam, és jégen előhűtött, 0,1cm-es elektroporációs küvettába raktam (BIO-RAD Gene-Pulser Cuvette Ca.: 1652089) A mintát BIO-RAD Micro Pulser elektroporátorral 1,8 kV feszültséggel elektroporáltam, majd

rögtön 1 ml SOC médiumot adtam hozzá és 1 órán át 37°C-on rázattam. A transzformánsokat ampicillin vagy kanamicin antibiotikummal kiegészített, X-gal-t tartalmazó LB lemezre szélesztettem ki.

#### **5.5.13. POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ**

Általában 20-50 µl végtérfogatban a reakcióelegyek templát DNS-ként plazmid vagy genomi DNS-t, valamint 1-1 pmol/µl primert, 200 µM dNTP-t, 1x DNS polimeráz puffert (Finnzymes) és 1 unit DyNAZyme DNS polimerázt (Finnzymes) tartalmaztak.

Azokban az esetekben, amikor szükség volt olyan polimerázra, amely megbízhatóbb átírási aktivitással rendelkezik *Pfu* (Fermentas) vagy *Pwo* polimerázt (Roche) használtam. Hybaid PCRExpress vagy Eppendorf 5415R típusú készülékben végeztem a reakciókat, melyek a következő lépéseket tartalmaztak: 2 perc 95°C-os denaturációt a primer-templát hibridizáció 50-70°C-on, majd ezt követően 0,5-1 perc/kb elongáció 72°C-on. A denaturáló, hibridzáló, elongációs lépéseket 30x ismételtem, majd a reakciót 5 percig tartó 72 °C-os termosztálással fejeztem be.

A Finnzymes Phusion polimerázának használatakor a program a következőképpen módosult: 30 másodperc 98°C-os denaturáció, a primer-templát hibridizációja 50-70°C-on, majd ezt követően 20-30 másodperc/kb elongáció 72°C hőmérsékleten az amplifikálni kívánt DNS hosszának megfelelő ideig. A denaturáló, hibridzáló, elongációs lépéseket 30x ismételtem, majd a reakciót 5 percig tartó 72 °C-os termosztálással fejeztem be.

#### **5.5.14. NUKLEOTIDSORREND MEGHATÁROZÁSA**

A DNS szekvencia meghatározások automata szekvenátorral (Applied Biosystem) készültek. A megfelelő klónok nukleotid sorrendjének meghatározására pBluescript, pET plazmidok szekvenáló oligonukleotidjait, illetve specifikus oligonukleotidokat használtam.

#### **5.5.15. SHOTGUN KÖNYVTÁR KÉSZÍTÉSE**

A kis inszerteket tartalmazó könyvtár készítésénél a genomi DNS megfelelő méretre való darabolására a legegyszerűbb és leghatékonyabb módszer a DNS fizikai törése. A fizikai törésre többféle lehetőség is létezik, leggyakrabban a szonikálást és a nebulizálást használják.

A nebulizátor egy kis műanyag készülék, amely sűrített levegő vagy nitrogén segítségével folyadék porítására képes. Ha a oldat nagy méretű DNS-t tartalmaz, akkor a folyadék porításával együtt a DNS-is darabolódik, a darabok mérete a gáz nyomásától és a kezelés időtartamától függ .

A *T. roseopersicina* genomi DNS-ének fizikai fragmentálására nebulizátort használtam. 30µg gDNS-hez 750 µl nebulizáló puffert adtam (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 20% glicerol) és a nebulizátor aljára pipettáztam. A készüléket jégen tartva nitrogén gáz segítségével 45 mp-ig 10 psi nyomáson nebulizáltam a DNS-t.

A pCR4Blunt-TOPO vektor jellemzője, hogy a vektor lineáris és topoizomeráz enzimekkel asszociált (lásd eredmények). A vektor 1µl-éhez 1µl sóoldatot (1,2M NaCl, 0,06M MgCl<sub>2</sub>), és 100ng-nyi tompított, defoszforilált DNS-t adtam. Az elegyet 5 percig szobahőn tartottam, majd jégen tároltam a transzformálásig.

#### **5.5.16. KOZMID KÖNYVTÁR KÉSZÍTÉSE**

A kozmid könyvtár készítéséhez az Epicentre által forgalmazott pWEB-TNC Kit-et használtam (Kat. szám: TNC9401).

A genomi DNS tisztításhoz 300 ml sejt kultúrát centrifugáltam, majd felvettem a sejteket 15ml Genomi 1-es oldatba (10mM NaCl, 20mM Tris pH=8, 1mM EDTA, 0,5% SDS, 100 µg/ml Proteináz K). Egy éjszakán át tartottam az oldatot 50°C-on, majd a fehérjéket fenol-kloroform 1:1 arányú elegyével extraháltam. A felső vizes fázishoz 0,1 térfogatnyi 3M-os Na-acetátot (pH=5,2) adtam és két térfogatnyi 96%-os etanolt adtam. A genomi DNS-t üvegbottal emeltem ki az oldatból, 75%-os etanollal mostam, majd levegőn szárítottam és desztillált vízbe vettem fel.

A centrifugálási lépéseket minden esetben 5000 x g-n végeztem a kíméletes eljárás érdekében.

A genomi DNS-t változó ideig tartó pipettázással törtem megfelelő méretűre. A DNS darabok végeit az Epicentre utasításai alapján tompítottam, majd a megfelelő méretű DNS darabok izolálása nélkül a teljes elegyet T4 DNS ligázzal pWEB-TNC vektorba ligáltam. A ligátumot a gyártó utasításai szerint fágfejbe csomagoltam, majd a fágokkal EPI100-T1R sejteket fertőztem. A kozmidot tartalmazó kolóniákra ampicilinnel szelektáltam.

#### **5.5.17. IRÁNYÍTOTT MUTAGENEZIS**

A mutagenezéshez a módosítandó fragmentet pBluescript SK+ vektorba építettem, majd a mutáció beviteléhez a Stratagene QuikChange II kit-et használtam. A mutagén primerek listáját az 1.6 rész tartalmazza (31. oldal). A mutánsok részletes leírása az *Eredmények és megbeszélésük* fejezetben található.

#### **5.5.18. AZ ISP2 TERMELTETÉSÉRE HASZNÁLT KONSTRUKCIÓ KÉSZÍTÉSE (pAT-ISP2)**

Az Isp2 túltermeltetéséhez isp2o1-isp2o2 primerekkel az *isp2* gént sokszorosítottam, majd a terméket pBluescript SK+ vektor *Sma*I helyére illesztettem (pBIS2). A pBIS2 plazmiból az *isp2* gént *Nde*I-*Bam*HI emésztéssel pET15b vektorba illesztettem *Nde*I- *Bam*HI helyre. Az így létrejött pAT-Isp2 konstrukció alkalmas az Isp2 fehérje IPTG indukálható termeltetésére, még hozzá úgy, hogy N-terminálisán egy His-tag fúziós partnert tartalmaz.

#### **5.5.19. A FEHÉRJE EXPRESSZIÓS VIZSGÁLATOKHOZ HASZNÁLT PLAZMID KÉSZÍTÉSE (pTSH51/1)**

A pTSH2/8 plazmidot *Eco*47III-*Kpn*I-el emésztettem, a végeket tompítottam, majd a vektortönmagára ligáltam. Az így létrejött plazmid tartalmazza a *hynS-isp1-isp2* géneket és rövidített formában a *hynL* gént, valamint csonkított szabályozó/promóter régióval rendelkezik.

#### 5.5.20. IN FRAME DELÉCIÓS MUTÁNSOK KÉSZÍTÉSE

##### 5.5.20.1. Az *isp1* és *isp2* gén mutációja (ISP12M)

A leolvasási keretet illesztő deléciós mutagenézishoz az *isp1,2* gének 5' régióját az otsh14- trhydo3 primerpárral amplifikáltam. A terméket pUC19 vektor tompított *Bam*HI helyére klónoztam be (pUNSBamHI). A 3' homológ régiót az isp1o7- isp2o2 primerekkel sokszoroztam fel, majd *Xba*I-el hasított és tompított pUNSBamHI vektorba illesztettem (pUS2). A pUS vektor 2,502 bázisos *Eco*RI fragmentjét pK18mobSacB vektorba *Eco*RI helyre illesztettem, az így kapott pISP12M plazmidot pedig *E. coli* törzsbe transzformáltam, majd *T. roseopersicina* S17-1 ( $\lambda$  pir) GB2131 törzsbe konjugáltam. Az egyszeres rekombináns telepekre kanamicinnel szelektáltam, majd a kiválasztott kolóniákat tápoldatban növesztettem fel. A másodlagos rekombinánsokra 3% szukróz tartalmú lemezekon szelektáltam. A szukróz rezisztens, de kanamicin szenzitív kolóniák genotípusát PCR-rel, Southern hibridizációval és szekvenálással ellenőriztem (ISP12M).

##### 5.5.20.2. Az *Isp1* gén mutációja (ISP1M)

Az 5' homológ régiót a pUNSBamHI vektor tartalmazza. A 3' homológ régiót az isp1o8- isp2o7 primerekkel amplifikáltam fel. A terméket *Bam*HI emésztett és tompított pUNSBamHI vektorba klónoztam (pUS3). A pUS3 plazmid *Eco*RI fragmentjét pK18mobSacB-be illesztettem (pISM1/3). A konstrukciót GB2131-be konjugáltam és a fent leírt módon szelektáltam a kettős rekombinánsokra (ISP1M).

#### 5.5.21. KOMPLEMENTÁLÓ KONSTRUKCIÓK KÉSZÍTÉSE

##### 5.5.21.1. pKIS1

Az *Isp1* mutáció komplementálásához egy olyan plazmid konstrukciót készítettem, amely pMHE6crtKm vektoron az *isp1* gén expresszióját a *T. roseopersicina* karotenoid promotere szabályozza (Fodor és mts., 2004). A karotenoid (*crt*) promóter egy anaerob körülmények között konstitutívan termelődő, ámde igen erős promóter a *T. roseopersicina* sejtekben (Kovács és mts., 2003). Az *isp1* gént isp1o1- isp1o5 primerpárral amplifikáltam, majd

pBluescript SK+ plazmidba *Sma*I helyre ligáltam (pIS1). A pIS1 plazmid *Nde*I-*Hind*III fragmentjét pK18mobsacB vektor *Nde*I-*Hind*III helyére illesztettem (pKIS1/2). Az így kapott konstrukciót ISP1M törzsbe konjugáltam.

#### 5.5.21.2. pKIST4

Az *Isp*1,2 mutáció komplementációjához olyan vektort készítettem, amely tartalmazza az *isp1-isp2* géneket pDSK509 vektorban *crt* promóter szabályozása alatt. Az *isp1-isp2* géneket otsh5r-*isp2o2* primerekkel amplifikáltam, majd a PCR terméket a pMHE6crtKm tompított *Nde*I-*Eco*RV helyére illesztettem (pHE12). A pHE12 vektor tompított *Bsu*15- *Bsu*36I fragmentjét – amely tartalmazza az *isp1,2* géneket, a *crt* promótert és a FLAG, StreptII fúziós partnereket) pDSK509-be helyeztem tompított *Bam*HI helyre (pKIST4). A kész konstrukciót ISP12M-be konjugáltam.

#### 5.5.22. PONTMUTÁNSOK KÉSZÍTÉSE

A mutációk alapjaként a pTHOE5M vektort használtam, mely tartalmazza a *T. roseopersicina hynS-isp1-isp2-hynL* operonját, és amelyről a HynSL enzimet aktívan ki tudjuk fejeztetni homológ gazdában. Ez a konstrukció szolgált kiindulópontként a mutációkat hordozó vektorok elkészítéséhez. A pTHOE5M vektorból egy 3273 bp-os darabot (amely tartalmazta a teljes nagy alegység génjét, valamint az *isp2* gén nagy részét) *Ap*aI restrikciós enzimmel kivágtam és pBluescriptSK+ plazmidba építettem, így a pBtHynLApA nevű konstrukciót kaptam. Ezen a plazmidon végeztem el az irányított mutagenézist. A mutagenézis kísérletekhez a Stratagene QuickChangeII csomagját használtam (katalógus szám: 200523).

### 5.6. FEHÉRJEMUNKÁK

#### 5.6.1. AZ *ISP1-ISP2* GÉNEK TRANSZLÁCIÓS ANALÍZISE

A T7 RNS polimeráz segítségével képződő RNS-ről átíródó fehérjék szelektíven jelölhetőek izotóppal jelölt aminosavakkal, amennyiben a sejt saját fehérje termelését rifampicinnel visszaszorítjuk. A rifampicin ugyanis gátolja a sejt saját DNS függő RNS polimerázát, viszont nincs hatással a T7 RNS polimerázra.

A pTSH51/1 plazmidot tartalmazó BL21 törzset M9 tápoldatban felnevesztettem  $OD_{600}=0,4$ -ig, majd ebből 1 ml kultúrát centrifugáltam. Az üledékben található sejteket 5%-ban aminosavkeveréket tartalmazó M9 tápoldatban vettem fel, majd további 30 percen át nevesztettem őket  $37^{\circ}\text{C}$ -on és  $42^{\circ}\text{C}$ -on rázatva. A T7 RNS polimerázt 1mM végkoncentrációjú IPTG-vel indukáltam, a sejtek saját fehérjetermelését 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  végkoncentrációjú rifampicinnel gátoltam. A sejteket  $42^{\circ}\text{C}$ -on tartottam 10 percig, majd 20 percig  $30^{\circ}\text{C}$ -on rázattam őket. Az izotópos jelölést 1ml kultúrából 500 $\mu\text{l}$ -en végeztem el, 10 $\mu\text{l}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-metionint (10 $\mu\text{Ci}$ ) adtam a sejtekhez és 5 percig  $30^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltam a keveréket. A sejteket centrifugálását követően 100 $\mu\text{l}$  feltáró pufferben (60mM Tris pH=6,8, 1% 2-merkaptotanol, 1% SDS, 10% glicerin, 0,01% brómfenolkék) szuszpendáltam. A mintákat  $100^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltam 5 percig, majd 12 % SDS-poliakrilamid gélen választottam el. A jeleket autoradiográfiásan hívtam elő.

#### **5.6.2. HETEROLÓG FEHÉRJE EXPRESSZIÓ**

3 ml LB tápoldatba 1 telepet oltottam le starter kultúrának és  $37^{\circ}\text{C}$ -on rázatva inkubáltam 12-16 órán át. A kultúrát 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  ampicillint tartalmazó LB tápoldatba oltottam át ezerszeres hígításban. A kultúrát  $30$ - $37^{\circ}\text{C}$ -on rázatva inkubáltam az  $OD_{600\text{nm}}=0,5$ - $0,8$ -as növekedési fázisig. Ezt követően 0,5-2 mM koncentrációjú IPTG-t adtam a kultúrákhoz, és 3-5 órán keresztül indukáltam a fehérjetermelődést. Ezek után a sejteket 10000xg-n centrifugáltam és 1.5-3 ml 1xPBS-ben (8g NaCl, 0,2g KCl, 1,15g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 0,2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 literre) szuszpendáltam fel.

#### **5.6.3. SEJT FELTÁRÁS**

1,5-3ml térfogatban szonikálással tártam fel a sejteket 1xPBS-ben (8g NaCl, 0,2g KCl, 1,15g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 0,2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 literre) háromszor-négyszer 20 mp-ig szonikáltam, majd a sejtextraktumot 20000xg-n, 30 percig centrifugáltam. A kapott felülúszó frakciót félretettem, a csapadékot pedig 1xPBS-ben szuszpendáltam.



#### **5.6.4. HIS-TAG FÚZIÓS FEHÉRJE TISZTÍTÁSA MCAC (METAL-CHELATE AFFINITY CHROMATOGRAPHY) MÓDSZERREL, DENATURÁLÓ KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT**

A NTA (nitrilotriecetsav) kelátképző szefaróz gyöngyöket (100ml tenyészetből származó mintához 5ml) 3 térfogat vízzel mostam, majd 5 térfogat 50mM NiCl<sub>2</sub> oldattal aktiváltam. Ezt követően 5-szörös térfogatú UMCAC-0 pufferrel hoztam egyensúlyba az oszlopot. A fehérje mintát tartalmazó oldatot átengedtem az így aktivált oszlopon és az átfolyt frakciót félretettem későbbi analízis céljából. 5 térfogat UMCAC-0 pufferrel mostam a fehérjét kötő oszlopot. UMCAC-1000 pufferből hígítási sort készítettem 20mM, 40mM, 60mM, 100mM, 200mM, 500mM imidazol végkoncentrációkkal. Ezekkel eluáltam az oszlopra kötött fehérjét.. Az elúció során 1-1,5ml-es frakciókat gyűjtöttem, melyeket eltettem későbbi analízisre (SDS-PAGE).

#### **5.6.5. DENATURÁLÓ POLIAKRILAMID GÉLELEKTROFORÉZIS (SDS-PAGE)**

1,5mm vastag denaturáló poliakrilamid gélt öntöttem, amely egy szeparáló, és egy felső, tömörítő gélből áll. A szeparáló gél 8-12% akrilamidot (akrilamid-bisakrilamid: 29:1), 0,01% SDS-t, 10% glicerint tartalmazott 0,4 M-os Tris pufferben (pH=8,8). A felső, tömörítő gél 7,5% akrilamidot és 0,01 % SDS-t tartalmazott 0,125 M-os Tris pufferben (pH=6,8). A mintákat 1x felvivő pufferben 10 percig 95°C-on inkubáltam, majd 70V-on 3-5 órán keresztül futtattam. A 6x felvivő puffer a következőket tartalmazta 10ml-ben: 7ml 4xTris-HCl/SDS, 3ml glicerint, 1g SDS, 0,93g DTT, 1,2mg brómfenolkék. A géleket futtatás után ezüsfestéssel vagy Coomassie BB-val festettem.

#### **5.6.6. EZÜSTFESTÉS**

A poliakrilamid géleket elektroforézis után körülbelül tízszeres mennyiségű fixáló oldatban (50% etanol, 12% ecetsav, 0.5 ml 30%-os formaldehid egy liter oldatban) enyhén rázattam több mint egy órán át. Ezután háromszor 20 percig mostam 50%-os etanolban, majd 2 percig előkezelő oldatban (0,2 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> × 5H<sub>2</sub>O 1 liter oldatban). Desztillált vizes öblítés után a géleket ezüst tartalmú impregnáló oldatban tartottam 20-30 percig (2 g AgNO<sub>3</sub>, 0,75 ml

37%-os formaldehid 1 literre számolva). Végül előhívó oldatban (60g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,5 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0,5 ml formaldehid) tartottam a géleket a fehérjék megjelenéséig, majd az előhívás folyamatát stop oldattal állítottam le (50% etanol, 12% ecetsav).

#### **5.6.7. COOMASSIE BB FESTÉS**

A poliakrilamid géleket elektroforézis után körülbelül tízszeres mennyiségű festő oldatban (50% etanol, 10% ecetsav, 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250 100 ml-enként) rázattam néhány órán át, majd kimosó oldattal (50% etanol, 10% ecetsav) oldottam ki a felesleges festéket a gélből.

#### **5.6.8. FEHÉRJE MENNYISÉGI MÉRÉSE LOWRY MÓDSZERREL (MICRO-LOWRY MÓDSZER)**

A fehérjét TCA-val való kicsapás után 800μl 0,25M NaOH-ban oldottam fel, majd a C reagensből (C reagens: 1 ml 6%-os nátrium-karbonátot összekevertem 20μl 15%-os rézsulfát és 3% nátrium-citrát keverékével) 300μl-t adtam a fehérje oldathoz és keverés után 15 percig szobahőn tartottam. Ezután 100μl 72%-os Folin reagenst adtam hozzá. 30 perc inkubálás után 750 nm-en mértem a fényelnyelést fotométerrel.

Az ismeretlen minták koncentrációját borjú szérum albuminból készített kalibrációs egyenes alapján állapítottam meg (Yeang és mts., 1998).

### **5.7. HIDROGENÁZ AKTIVITÁS MÉRÉSEI MÓDSZEREK**

#### **5.7.1. IN VIVO HIDROGÉN TERMELÉS - VISSZAVÉTEL MÉRÉSE GÁZKROMATOGRÁFFAL**

A baktérium törzseket 60 ml, 5μM NiCl<sub>2</sub> tartalmú Pfennig féle tápoldatban, hipovial üvegekbe oltottam le, nitrogén gázzal anaerobizáltam, majd 6 napos növesztést követően a gáztérből 200μl mintát vettem Hamilton fecskendővel és gázkromatográfba fecskendeztem (Agilent 6890 gázkromatográf, Molekular sieve 5 kolonna, TCD detektor). Hidrogén visszavétel mérésekor a légtérrel leoltás után hidrogénnel mostam át és a sejtek felnövesztése után 20μl gázt lőttem be a gázkromatográfba.

### **5.7.2. HIDROGÉN FELVÉTEL MÉRÉSE *IN VITRO* MESTERSÉGES ELEKTRON AKCEPTOR JELENLÉTÉBEN**

$H_2 + BV_{(ox)} = 2 H^+ + BV_{(red)}$ . Ebben az egyenletben az „BV” benzil-viologént jelent. A mérés elvi alapját az képezi, hogy az anaerob körülmények közt aktiválódó HynSL enzim a légtér  $H_2$  tartalmát elbontva redukálja a benzil-viologént, ami a redukció következtében elkékül. Mivel a folyamatot színváltozás kíséri, spektrofotométerrel 600nm-en jól követhető. A méréshez előkészített mintám a következőket tartalmazta: a mérendő oldatot, 20mM-os foszfát pufferrel (pH=7,0) 2 ml-re kiegészítve, és 40  $\mu$ l 40mM-os benzil-viologént. Ezeket anaerob küvettákba zártam, majd hidrogénnel anaerobizáltam és a 60 °C-on tartott küvettartóba helyeztem. A mérést 600 nm-en végeztem. A abszorbancia idő szerinti deriváltja megadja, hogy adott eltelt idő alatt mennyi benzil-viologént tudott elredukálni a rendszer, ez pedig arányos a hidrogén oxidáció kinetikájával (Bagyinka és Kovács, 1982).

### **7.7.3. HIDROGÉNTERMELÉS MÉRÉSE *IN VITRO* MESTERSÉGES ELEKTRONDONOR JELENLÉTÉBEN**

10 ml-es hipovial üvegbe összemértem a mérendő elegyet, kiegészítettem 5ml-re foszfát pufferrel (pH=7,0), majd hozzáadtam 40  $\mu$ l 40 mM-os metil-viologént. A hipovial üveget lezárása után nitrogénnel anaerobizáltam, majd 100  $\mu$ l 50mg/ml koncentrációjú nátrium-ditionit oldatot fecskendeztem be ezzel elredukálva az összes metil-viologént, ami így elektrondonorként fog működni. A termelt hidrogént 8 óra elteltével mértem meg gázkromatográffal.

### **5.8. SZOLUBILIS- ÉS MEMBRÁNFRAKCIÓK SZÉTVÁLASZTÁSA**

50 ml *T. roseopersicina* kultúrát 7000 x g-n 10 percig centrifugáltam, majd a sejteket felfuszpendáltam 1ml 20mM-os K-foszfát pufferben (pH=7,0) és jégen 8-szor 10 másodpercig szonikáltam. A feltárt sejteket 15000 x g-n 10 percig centrifugáltam, ezzel eltávolítottam a feltáratlan sejteket és a kénkristályokat. A membrán/citoplazma frakció szétválasztásához az

előző centrifugálás felülúszóját 100000 x g-n 1,5 órán át centrifugáltam (Hanczár és mts., 2002). A felülúszót, mint citoplazma frakciót elválasztottam, a csapadékot pedig a citoplazma frakcióval arányos mennyiségű 20mM-os K-foszfát pufferben (pH=7,0) vettem fel.

## **5.9. BAKTERIOKLOROFILL MENNYISÉGÉNEK MEGHATÁROZÁSA**

A bakterioklorofill mennyisége fototróf kénbaktériumok esetében pontosabb meghatározója a sejtszámnak, mint az OD mérés, mert a kénglobulusok befolyásolják a sejtek fényelnyelését. A méréshez 10 ml *T. roseopersicina* kultúrát centrifugáltam 15000 rpm fordulatszámon, majd a leülepedett sejtek tetejére 2 ml metanolt pipettáztam. Sötétben, 2 óra alatt enyhe rázatás mellett a bakterioklorofill kioldódott, ami kék színváltozással járt. A felülúszó fényelnyelését 772 nm-en megmértem, és  $8,41\text{g}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}$  extinkciós koefficiens értékkel a bakterioklorofill tartalmat meghatároztam (Stal és mts., 1984). Az *in vivo* és *in vitro* hidrogenáz aktivitást mérési eredményeket bakterioklorofill mennyiségre normáltam.

## 6. EREDMÉNYEK ÉS TÁRGYALÁSUK

### 6.1. A HYNOPERON JELLEMZÉSE

#### 6.1.1. A HYNH GÉN JELLEMZÉSE

A *hynS-isp1-isp2-hynL* gének átíródása az Fnr rendszer szabályozása alatt áll. A *hupS* gén start kodonja előtti -602 és -514 közötti régió felelős az FnrT fehérje kötéseért, melyen keresztül oxigén szabályozza a Hyn hidrogenáz expresszióját (Kovács és mts., 2005). A *hynS* gén és az FnrT kötőhely között egy eddig nem ismert, 453 bázispár hosszúságú gén található, mely az *in silico* homológia vizsgálatok alapján a membrán kötött hidrogenázoknál a HupH típusú fehérjékhez hasonlít a legjobban, így a HynH nevet kapta. A HynH fehérje jelentős hasonlóságot mutat az *Azotobacter vinelandii* HoxQ (65,7%), a *Ralstonia eutropha* HoxQ (50,4%) valamint a *Rhizobium leguminosarum* HupH (45,4%) fehérjéjével. A HupH típusú fehérjék több organizmus membránkötött hidrogenázának operonjában megtalálhatóak (Vignais és mts. 2001).

*Rhizobium leguminosarum*-ban bizonyították, hogy a HupH delécioja a Hup hidrogenáz teljes aktivitásvesztését okozza (Manyani és mts. 2005), azonban a fehérje szerepe sokkal komplexebb ebben a baktériumban. A HupH szükséges a kis alegység éréséhez, és a HupS-HupL komplex stabilitásához is, még mielőtt a Tat transzlokáz a membránba szállítaná a dimert. Magához a transzport folyamatához is szükség van a HupH fehérjére, mutációja esetén a HupS-HupL dimer a citoplazmában marad (Manyani és mts. 2005).

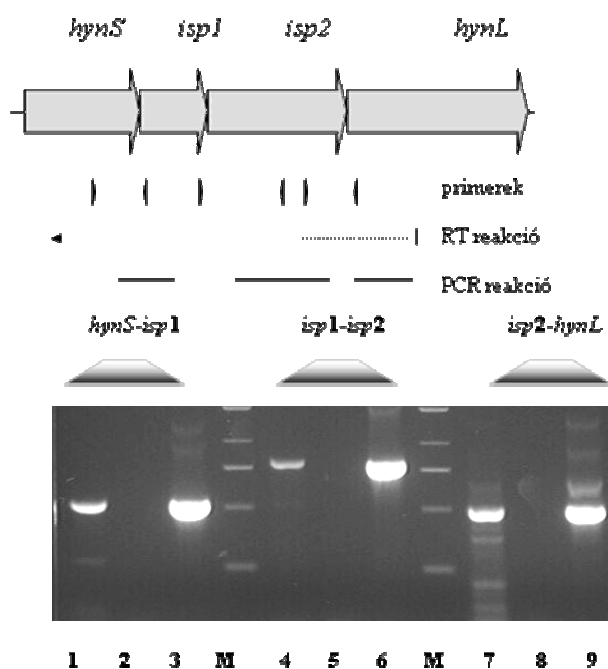
#### 6.1.2. AZ ISP1-ISP2 GÉNEK

A Hyn hidrogenáz struktúrgénjei között található *isp1-isp2* gének szerepe jelenleg nem ismert. A tisztított Hyn hidrogenáz csak a kis és a nagy alegységet tartalmazza (Kovács és mts. 1985). A szokásos elrendeződéssel ellentétben az operonba beékelődő két gén feltételezett fehérjeszekvenciája homológiát mutat a DsrKM (dissimilatory sulfite reductase) fehérjék szekvenciáival. Az Isp2 FeS tartalmú fehérjének tűnik, míg *in silico* analízis alapján az Isp1 egy b-típusú hem-tartalmú transzmembrán fehérje.

### 6.1.3. A *HYNS-ISP1-ISP2-HYNL* GÉNEK TRANSZKRIPCIÓJÁNAK ANALÍZISE

Annak vizsgálatához, hogy a *hynS-isp1-isp2-hynL* gének együtt íródnak-e át, RT-PCR analízist végeztem *T. roseopersicina* genomi RNS-en. A reverz-transzkriptáz iniciációs pontjaként az *otsh8* primert használtam (7. ábra). A képződött cDNS-t templátként használtam a *otsh11-otsh14* (*hynS-isp1*) *otsh15-otsh7* (*isp1-isp2*) és *otsh16-otsh8* (*isp2-hynL*) primerpárokkal végrehajtott PCR reakciókhoz.

A kísérlet igazolta, hogy a *hynS-isp1-isp2-hynL* gének egy operont alkotnak.



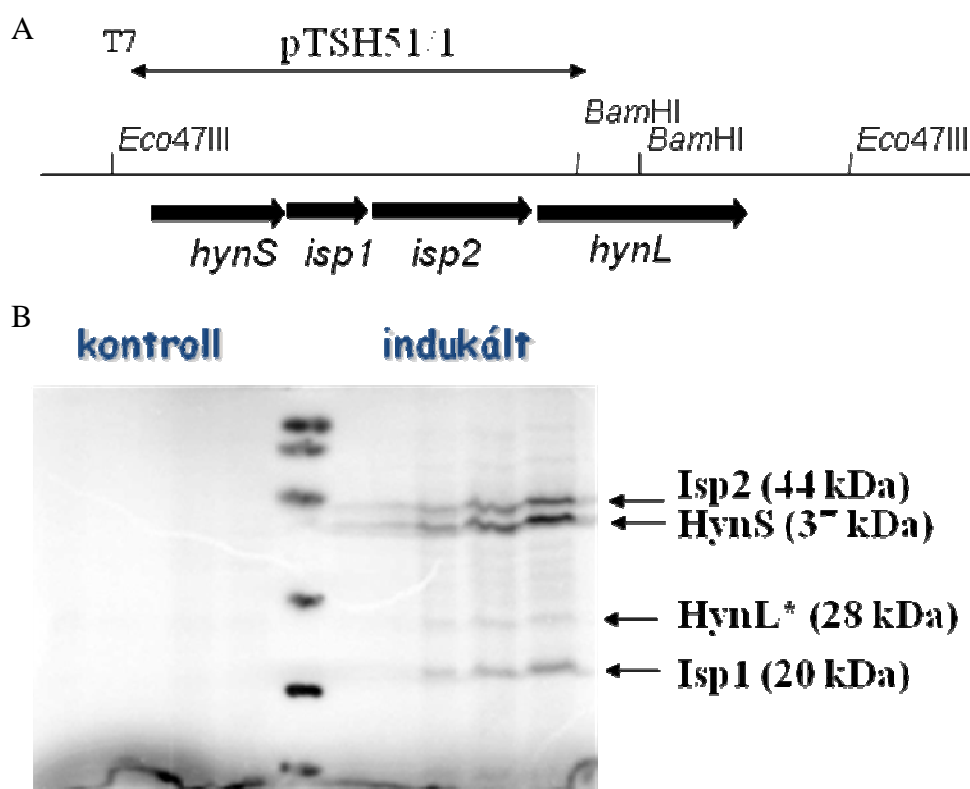
8. ábra: A *hynS-isp1-isp2-hynL* transzkripció analízise

(M: marker 2,5,8: negatív kontroll, 3,6,9: pozitív kontroll, 1,4,7: RT-PCR reakció)

### 6.1.4. AZ ISP1-ISP2 FEHÉRJÉK VIZSGÁLATA T7 EXPRESSZIÓS RENDSZERREL

Miután bebizonyosodott, hogy a kis alegység, a nagy alegység és a közöttük található két nyitott leolvasási keret egy transzkripciós egységet alkot, felvetődött a kérdés, hogy a gének valódi fehérjéket kódolnak-e. A kérdés megválaszolásához T7 expressziós kísérletet végeztünk

egy olyan vektoron (pTSH51/1), amely tartalmazta a *hynS-isp1-isp2* géneket, valamint a *hynL* N-terminális végéből 375 bázispárnyi szakaszt. A gének ebben a konstrukcióban a T7 expressziós rendszer szabályozása alatt állnak. A plazmidról átíródó fehérjék képződését *E. coli*-ban IPTG-vel indukáltam, a képződő fehérjéket [<sup>35</sup>S]-metionin izotóppal jelöltem. A sejt saját fehérjetermelését rifampicinnel gátoltam, amely nem hat a T7 expressziós rendszerre, így a plazmidról képződő fehérjék elkülöníthetők a sejt által termelt *E. coli* fehérjéktől. Mint ahogy a 8. ábrán látható, négy polipeptid termelődött, amelyek méretben megfeleltethetők az Isp1, Isp2, HynS, valamint a csonka HynL fehérjéknek.



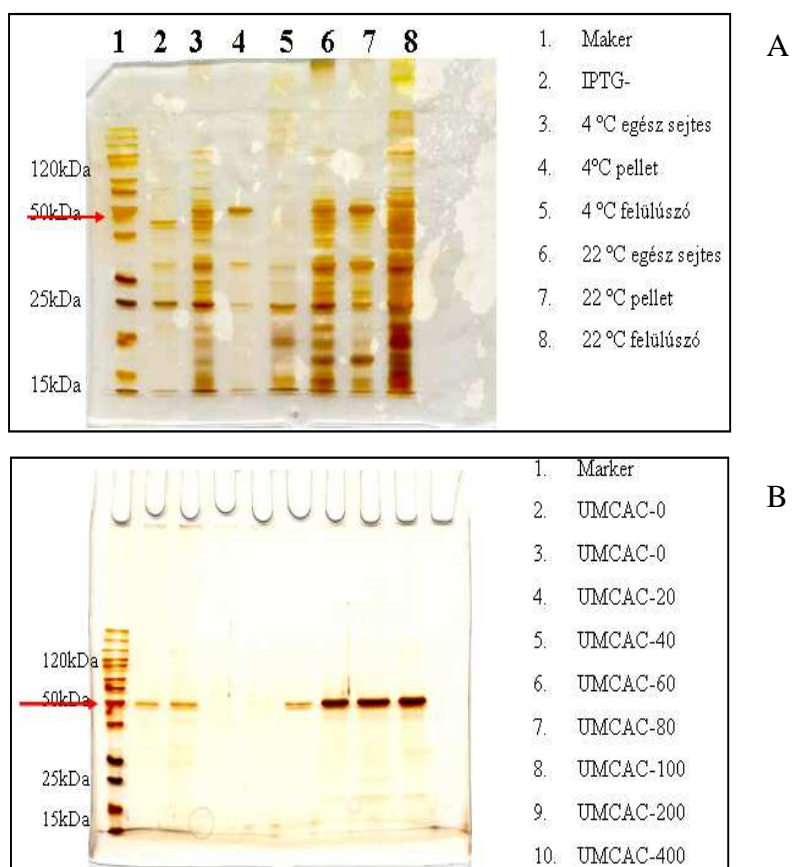
**8. ábra: Az Isp1-Isp2 fehérjék transzlációs vizsgálata.**

A) A termeltetéshez használt operonszakasz. B) T7 RNS polimeráz hajtott fehérjetermelés. A bal oldalon (kontroll) található minták az üres vektorral végzett kísérletet mutatja. Jobb oldalon (indukált) látható pTSH51/1 plazmid termeltetéséből kapott fehérjesávok különböző koncentrációkban. HynL\*: csonka HynL fehérjetermék, mivel a pTSH51/1 plazmid a *hynL*

génnek csak az elejét tartalmazza.

## 6.2. AZ ISP2 FEHÉRJE TÚLTERMELTETÉSE *E. COLI*-BAN

Az Isp2 fehérje heterológ gazdában való termeltetéséhez és tisztításához a pAT-Isp2 plazmidkonstrukciót használtam, amely pET15b vektorban tartalmazza az *isp2* gént C-terminális His-tag fúziós partnerrel. A fehérje minden növesztési hőmérsékleten (37°C, 22°C, 16°C, 4°C) oldhatatlan formátumban termelődött (9.a ábra), ezért denaturáló körülmények között végeztem a tisztítást. Az oldatba vitt fehérjék fémkelátképző affinitás kromatográfiával tisztíthatóak voltak (9.b ábra).

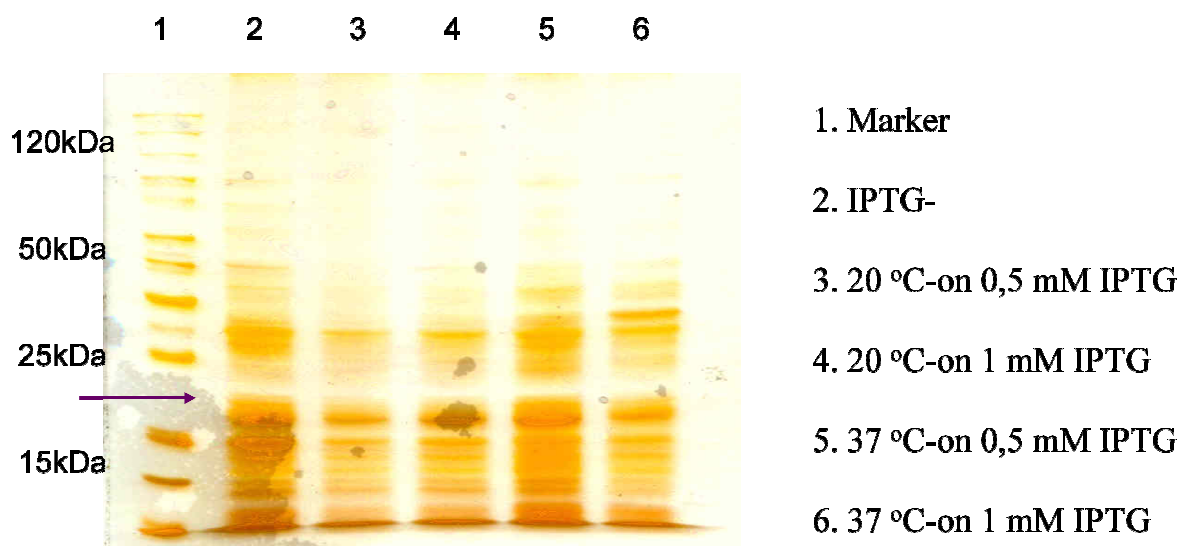


9. ábra: Az Isp2 fehérje termeltetése heterológ gazdában, valamint a fehérjék tisztítása fémkelátoló affinitás kromatográfiával denaturáló körülmények között.



### 6.3. AZ ISP1 FEHÉRJE TÚLTERMELTETÉSE *E. COLI*-BAN

Az Isp1 fehérje túltermeltetését is hasonló módon pET-15b vektorba klónozva, *E. coli*-ban próbáltam különböző IPTG koncentrációk mellett és különböző hőmérsékleteken, azonban a fehérje túltermeltetése nem volt sikeres (11. ábra). Az ok valószínűleg az, hogy az Isp1 egy integráns membránfehérje, és a membránfehérjék túltermeltetése általában sok nehézségbe ütközik. Jelenleg homológ gazdában, *T. roseopersicina*-ban próbálkozunk az Isp fehérjék tisztításával, mely módszer segítségével akár az Isp fehérjékkel kapcsolódó más fehérjék azonosítása is lehetséges.



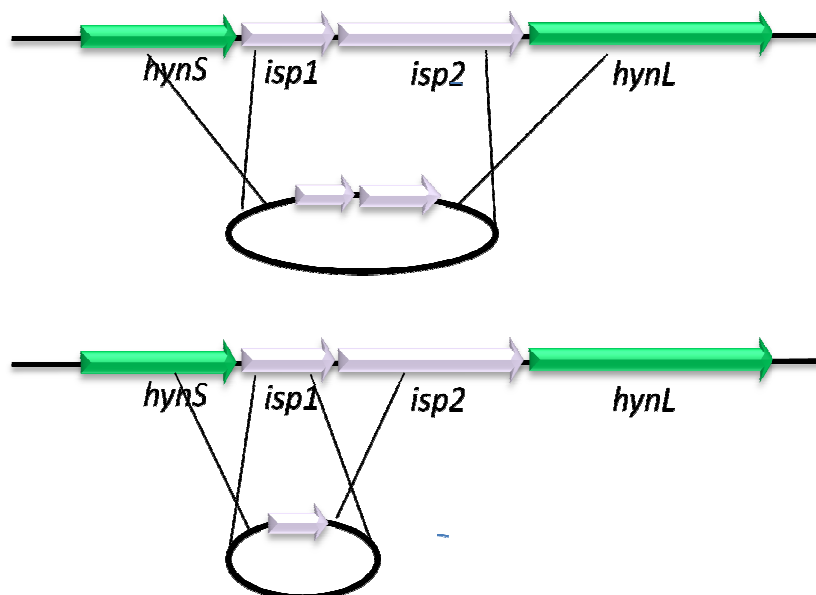
10. ábra: az Isp1 fehérje termeltetése *E. coli*-ban

(a nyíl az Isp1 fehérje várható méretét jelzi)

### 6.4. A ISP1 ÉS 2 FEHÉRJÉK MUTÁCIÓJA

Miután bebizonyosodott, hogy az *isp1*, *isp2* gének valódi fehérjéket kódolnak, és együtt íródnak át a HynS és HynL fehérjékkel, felmerült a kérdés, hogy vajon milyen szerepük van ezeknek a fehérjéknek a Hyn hidrogenáz felépítésében, aktivitásában. Ennek kiderítésére különböző mutáns törzseket hoztam létre.

Az Isp1, Isp2 fehérjék mutációjához konstrukciót készítettem, amely segítségével a genomból deletálhatóak a vizsgálni kívánt gének, viszont a többi gén (*hynS*, *hynL*) átíródása a környezetében nem sérül. Ez a módszer az ún. "in frame deléció" (11. ábra).



11. ábra: az *isp1,2* valamint az *isp1* in frame deléciója

Mindkét *isp* gén kiütéséhez egy olyan plazmid konstrukciót készítettem, amely az *isp1* gén elejéből 120 bázispárt, az *isp2* gén végéből pedig 27 bázispárt pK18mobsacB vektoron a leolvasási keretet megtartva. Az így keletkező csonka fehérje nem tudja ellátni szerepét. A konstrukciót GB2131 törzsbe juttattam, ami csak a Hyn hidrogenázt, valamint a Hox2 hidrogenázt tartalmazza. Ez utóbbi enzim azon mérési körülmények között, amelyeket a Hyn mérésére alkalmaztam (glükóz mentes PC tápoldat) nem mutat aktivitást, így szelektíven tudtam vizsgálni az Isp fehérjék mutációjának a Hyn hidrogenázra kifejtett hatását.

Az Isp1 fehérje mutációját hasonló módon készítettem, ez a konstrukció az *isp1* gén elejéből 120 bázispárt, míg a végéből 42 bázist tartalmaz, míg a *hynS-isp2-hynL* gének átíródása zavartalan marad.

A mérések során pozitív kontrollként a GB2131 törzset használtam, ami csak a Hyn és a Hox2 hidrogenázt tartalmazza, negatív kontrollként pedig a GB112131 törzset, amelyben csak a Hox2 hidrogenáz termelődik, de aktivitása nem mérhető. A másik negatív kontroll az M539-

es törzs volt, amelyben transzpozonos mutagenézissel a *hypF* gén lett elroncsolva. A HypF minden hidrogenáz éréséhez nélkülözhetetlen kisegítő fehérje, tehát ebben a törzsben egyáltalán nem termelődik aktív hidrogenáz enzim (Fodor és mts. 2001).

Az *in vivo* aktivitásmérések során azt tapasztaltam, hogy a Hyn hidrogenáz hidrogéntermelő aktivitása megszűnik mind az Isp1,2 duplamutáns, mind az Isp1 mutáns törzsekben (1. táblázat). Az *in vivo* hidrogén visszavétel ezzel ellentétben nem szűnt meg teljesen, csak jelentős mértékben lecsökkent mindkét törzs esetében, ami egy alternatív, azonban kevésbé hatékony elektron transzport útvonal meglétét feltételezi.

törzs	<i>in vivo</i> relatív hidrogén termelés	<i>in vivo</i> relatív hidrogén visszavétel	<i>in vitro</i> relatív hidrogén felvétel
GB2131 ( $\Delta hupSL$ , $\Delta hoxH$ )	100 $\pm$ 10,2	100 $\pm$ 13,7	100 $\pm$ 10,0
ISP1M ( $\Delta hupSL$ , $\Delta hoxH$ , $\Delta isp1$ )	0	29,5 $\pm$ 9,8	100,4 $\pm$ 9,2
ISP12M ( $\Delta hupSL$ , $\Delta hoxH$ , $\Delta isp12$ )	0	35,6 $\pm$ 5,9	116,2 $\pm$ 8,3
GB112131 ( $\Delta hupSL$ , $\Delta hoxH$ , $\Delta hynS$ - <i>isp1-isp2-hynL</i> )	0	0	0
M539 ( $\Delta hypF$ )	0	0	0

**1. táblázat.: Az Isp fehérjék mutációjának hatása a Hyn hidrogenáz aktivitására.**

**Az értékek százalékos értékek a GB2131-es törzshöz viszonyítva.**

**A törzseket 4g/l tioszulfát tartalmú PC tápoldaton növesztettük. Az értékeket bakterioklorofill tartalomra normáltam.**

Az *in vitro* aktivitás - amikor benzilviologént használunk, mint mesterséges elektron donorként - nem változott az Isp1, valamint az Isp1,2 fehérjék kiütésének hatására sem. Ez azt

jelenti, hogy a Hyn hidrogenáz *in vitro* aktivitására nincs hatással az Isp fehérjék hiánya, más szóval, az enzim poszttranszlációs érését, expressziós szintjét (összességében bioszintézisét) nem befolyásolják az Isp fehérjék. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy az Isp fehérjék mutációja természetes körülmények között megállította az elektronáramlást a Hyn hidrogenáztól, illetve a felé. Ezt a hipotézist erősíti, hogy a heterodiszulfid reduktázokhoz hasonló Isp2 valószínűleg egy oxidoreduktáz enzim, amelynek redox szubsztrátját mindeddig nem azonosították, de feltételezhetően közvetett kapcsolatban áll a központi redox folyamatokkal.

Annak igazolására, hogy valóban az Isp fehérjék mutációja okozza a fent leírt hatásokat, komplementáló plazmid konstrukciókat készítettem. Az Isp1 mutációjának komplementálásához a pKIS1 konstrukciót használtam, amely pMHEcrtKm vektorban tartalmazza az *isp1* gént. A dupla mutáns komplementálásához pedig a pKIST/4 plazmidot juttattam a megfelelő sejtekbe. A plazmidokat ISP1M/3 (*isp1*<sup>-</sup>, *isp2*<sup>+</sup>) és ISP12M törzsekbe konjugáltam. Az *in vivo* aktivitás mérések során azt tapasztaltam, hogy az Isp1,2 mutánsok lecsökkent aktivitását visszaállította a komplementáló konstrukció (2. táblázat).

törzs	<i>in vivo</i> relatív hidrogén termelés	<i>in vivo</i> relatív hidrogén visszavétel	<i>in vitro</i> relatív hidrogén felvétel
GB2131 ( $\Delta hupSL$ , $\Delta hoxH$ )	100 $\pm$ 10,2	100 $\pm$ 13,7	100 $\pm$ 10,0
pKIS1/ISP1M ( $\Delta hupSL$ , $\Delta hoxH$ , $\Delta isp1$ )	170 $\pm$ 40	115 $\pm$ 13,6	-
pKIST4/ISP12M ( $\Delta hupSL$ , $\Delta hoxH$ , $\Delta isp1$ , $\Delta isp2$ )	48 $\pm$ 10,5	153 $\pm$ 19,3	-

## 2. táblázat: a mutációk komplementálásának hatása a Hyn hidrogenáz aktivitására

Mivel a számítógépes analízis alapján az Isp1 egy integrált membránfehérje, valószínűsíthető, hogy a HynSL dimert az Isp1 rögzíti a membránhoz. Ennek igazolásához megvizsgáltuk a Hyn lokalizációját a különböző sejtfrakciókban. A várakozásokkal ellentétben

az *in vitro* aktivitás nagy része a membrán frakcióban maradt akkor is, ha csak az Isp1 fehérjét távolítottuk el a sejtekből és akkor is, ha mind a két Isp fehérjét. Ez azért is meglepő, mivel a HynSL *in vivo* aktivitása meggyőzően kapcsolódik az Isp1,2 fehérjék jelenlétéhez. Azonban a Hyn hidrogenáz membránkötöttsége magyarázatot adhat arra is, hogy bár a DsrK és DsrM fehérjék komplementálhatják az Isp1, Isp2 hiányának hatását, ez a helyettesítés csak egyirányú, hidrogén termelés irányában nem működik. Az ugyanis, hogy az Isp fehérjék hiánya nincs hatással az enzim lokalizációjára, feltételez egy másik fehérjét, amely az enzim membránhoz való kötéseért felelős. Amennyiben ez a fehérje a kinon raktár felé szállítja az elektronokat (pl. citokróm-b), az elektronáramlás csak egyirányú lehet, tehát a hidrogén termelő aktivitás nem valósulhat meg.

Azt is meg kell említeni, hogy a Hyn enzim tisztítása során azt tapasztaltuk, hogy a HynSL fehérjék csak gyengén kapcsolódnak a membránhoz, arról könnyen lemoshatóak (Kovács és mts. 1985). Meglepő módon a kapcsolódás erőssége nem függ az Isp1 hiányától illetve jelenlététől.

törzs	<i>in vitro</i> relatív hidrogén felvevő aktivitás	
	membrán frakció	szolubilis frakció
GB2131 ( $\Delta hupSL$ , $\Delta hoxH$ )	100 $\pm$ 23,2	100 $\pm$ 7,7
ISP1M ( $\Delta hupSL$ , $\Delta hoxH$ , $\Delta isp1$ )	106,2 $\pm$ 33,4	102,7 $\pm$ 4,0
ISP12M ( $\Delta hupSL$ , $\Delta hoxH$ , $\Delta isp12$ )	112,4 $\pm$ 0,3	113,9 $\pm$ 6,8
GB112131 ( $\Delta hupSL$ , $\Delta hoxH$ , $\Delta hynS$ - $isp1$ - $isp2$ - $hynL$ )	0	0
M539 ( $\Delta hypF$ )	0	0

### 3. táblázat: az Isp fehérjék mutációjának hatása a Hyn hidrogenáz lokalizációjára.

Az értékek százalékos értékek a GB2131-es törzzsel összehasonlítva.

A törzseket 4g/l tioszulfát tartalmú PC tápoldaton növesztettem. Az értékeket bakterioklorofill tartalomra normáltam.

## 6.5. AZ ISP2 KONZERVÁLT AMINOSAVAINAK VIZSGÁLATA

Az Isp2 fehérje jelenléte a *hyn* operonban különleges, hiszen a fehérje funkciójáról nem sok mindent tudunk mondani, azonban a *Hyn* hidrogenáz *in vivo* aktivitásához nélkülözhetetlen. Az Isp2 aminosav szekvenciájának vizsgálata során kiderült, hogy két, ferredoxin típusú FeS kocka kötőhelyet tartalmaz (Rákhely és mts. 1998).

Az Isp2 a konszenzus szekvenciákon kívül több, erősen konzervált aminosavat tartalmaz, amelyek funkciója hatással lehet az Isp2 fehérje aktivitására (12. ábra). A konzervált aminosavak egy része nem önállóan, hanem csoportokat alkotva helyezkedik el.

Az Isp2-ben található aminosavak funkciójának vizsgálata érdekében pontmutánsokat készítettem, amelyekben a konzervált aminosavakat egy teljesen más karakterű aminosavra cseréltem le. A pontmutációt olyan plazmidon vizsgáltam, amely tartalmazza a teljes *hyn* operont (*hynS-isp1-isp2-hynL*) (pTHOE5M) a GB112131 ( $\Delta hyn$ ,  $\Delta hup$ ,  $\Delta hox$ ) törzsben. Pozitív kontrollként GB2131 törzset ( $\Delta hup$ ,  $\Delta hox$ ), valamint pTHOE5M/GB112131 törzset, negatív kontrollként pedig M539-et ( $\Delta hypF$ ), GB112131-et valamint egy olyan plazmidot tartalmazó törzset használtam, ami csak a kis és nagy alegység génjét tartalmazza (pTHOE51M/GB112131).

Azon aminosavak esetén, amelyek csoportokat alkotnak, a pontmutációt úgy végeztem el, hogy a csoportba tartozó összes aminosavat kicseréltem egy különböző karakterű aminosavra, és az együttes hatásukat vizsgáltam. Később egyes aminosavakat megvizsgáltam a csoporton belül is azon céllal, hogy vajon egyedi mutációjuk okozza-e azt az aktivitáskülönbséget, amit a csoport aminosavainak lecserélésénél tapasztaltam (ISP2MCL2, ISP2MCL1).

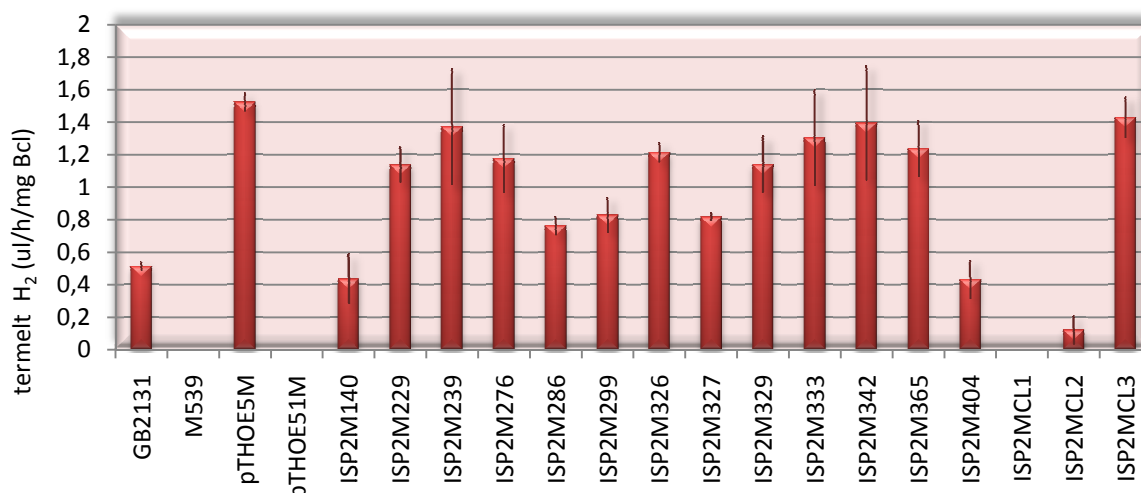
A pontmutáns törzseken aktivitás méréseket végeztem *in vivo* hidrogén termelés és hidrogén felvétel, valamint *in vitro* hidrogén felvétel irányában.

M<sup>1</sup>S<sup>2</sup>E<sup>3</sup>L<sup>4</sup>T<sup>5</sup>L<sup>6</sup>E<sup>7</sup>Q<sup>8</sup>G<sup>9</sup>R<sup>10</sup>A<sup>11</sup>Q<sup>12</sup>S<sup>13</sup>Q<sup>14</sup>D<sup>15</sup>A<sup>16</sup>P<sup>17</sup>K<sup>18</sup>A<sup>19</sup>S<sup>20</sup>E<sup>21</sup>L<sup>22</sup>T<sup>23</sup>L<sup>24</sup>E<sup>25</sup>R<sup>26</sup>G<sup>27</sup>L<sup>28</sup>A<sup>29</sup>A<sup>30</sup>  
F<sup>31</sup>R<sup>32</sup>A<sup>33</sup>E<sup>34</sup>V<sup>35</sup>D<sup>36</sup>G<sup>37</sup>P<sup>38</sup>V<sup>39</sup>A<sup>40</sup>A<sup>41</sup>F<sup>42</sup>F<sup>43</sup>S<sup>44</sup>S<sup>45</sup>C<sup>46</sup>V<sup>47</sup>H<sup>48</sup>C<sup>49</sup>G<sup>50</sup>I<sup>51</sup>C<sup>52</sup>A<sup>53</sup>Q<sup>54</sup>A<sup>55</sup>C<sup>56</sup>P<sup>57</sup>  
E<sup>58</sup>Y<sup>59</sup>L<sup>60</sup>E<sup>61</sup>T<sup>62</sup>G<sup>63</sup>D<sup>64</sup>P<sup>65</sup>K<sup>66</sup>Y<sup>67</sup>T<sup>68</sup>P<sup>69</sup>I<sup>70</sup>L<sup>71</sup>K<sup>72</sup>L<sup>73</sup>E<sup>74</sup>P<sup>75</sup>L<sup>76</sup>R<sup>77</sup>R<sup>78</sup>V<sup>79</sup>W<sup>80</sup>E<sup>81</sup>N<sup>82</sup>D<sup>83</sup>F<sup>84</sup>T<sup>85</sup>  
L<sup>86</sup>W<sup>87</sup>G<sup>88</sup>K<sup>89</sup>I<sup>90</sup>K<sup>91</sup>G<sup>92</sup>L<sup>93</sup>F<sup>94</sup>G<sup>95</sup>L<sup>96</sup>N<sup>97</sup>H<sup>98</sup>K<sup>99</sup>V<sup>100</sup>T<sup>101</sup>D<sup>102</sup>A<sup>103</sup>M<sup>104</sup>L<sup>105</sup>A<sup>106</sup>E<sup>107</sup>W<sup>108</sup>E<sup>109</sup>  
E<sup>110</sup>L<sup>111</sup>L<sup>112</sup>Y<sup>113</sup>D<sup>114</sup>S<sup>115</sup>C<sup>116</sup>S<sup>117</sup>M<sup>118</sup>C<sup>119</sup>G<sup>120</sup>R<sup>121</sup>C<sup>122</sup>S<sup>123</sup>M<sup>124</sup>V<sup>125</sup>C<sup>126</sup>P<sup>127</sup>V<sup>128</sup>G<sup>129</sup>N<sup>130</sup>  
D<sup>131</sup>L<sup>132</sup>A<sup>133</sup>L<sup>134</sup>M<sup>135</sup>I<sup>136</sup>R<sup>137</sup>K<sup>138</sup>S<sup>139</sup>R<sup>140</sup>E<sup>141</sup>G<sup>142</sup>M<sup>143</sup>V<sup>144</sup>Q<sup>145</sup>A<sup>146</sup>G<sup>147</sup>H<sup>148</sup>A<sup>149</sup>P<sup>150</sup>E<sup>151</sup>  
G<sup>152</sup>L<sup>153</sup>I<sup>154</sup>A<sup>155</sup>A<sup>156</sup>S<sup>157</sup>V<sup>158</sup>R<sup>159</sup>A<sup>160</sup>I<sup>161</sup>Q<sup>162</sup>T<sup>163</sup>G<sup>164</sup>S<sup>165</sup>P<sup>166</sup>M<sup>167</sup>G<sup>168</sup>L<sup>169</sup>Q<sup>170</sup>W<sup>171</sup>K<sup>172</sup>  
T<sup>173</sup>L<sup>174</sup>A<sup>175</sup>V<sup>176</sup>Q<sup>177</sup>I<sup>178</sup>N<sup>179</sup>H<sup>180</sup>V<sup>181</sup>E<sup>182</sup>T<sup>183</sup>S<sup>184</sup>S<sup>185</sup>G<sup>186</sup>L<sup>187</sup>K<sup>188</sup>V<sup>189</sup>P<sup>190</sup>V<sup>191</sup>D<sup>192</sup>Q<sup>193</sup>  
P<sup>194</sup>G<sup>195</sup>A<sup>196</sup>E<sup>197</sup>Y<sup>198</sup>L<sup>199</sup>V<sup>200</sup>L<sup>201</sup>L<sup>202</sup>S<sup>203</sup>S<sup>204</sup>M<sup>205</sup>E<sup>206</sup>I<sup>207</sup>I<sup>208</sup>N<sup>209</sup>F<sup>210</sup>P<sup>211</sup>E<sup>212</sup>Y<sup>213</sup>L<sup>214</sup>E<sup>215</sup>  
A<sup>216</sup>I<sup>217</sup>T<sup>218</sup>K<sup>219</sup>I<sup>220</sup>F<sup>221</sup>D<sup>222</sup>H<sup>223</sup>A<sup>224</sup>G<sup>225</sup>V<sup>226</sup>T<sup>227</sup>W<sup>228</sup>T<sup>229</sup>L<sup>230</sup>S<sup>231</sup>T<sup>232</sup>E<sup>233</sup>C<sup>234</sup>F<sup>235</sup>E<sup>236</sup>  
A<sup>237</sup>T<sup>238</sup>N<sup>239</sup>A<sup>240</sup>G<sup>241</sup>I<sup>242</sup>Q<sup>243</sup>I<sup>244</sup>G<sup>245</sup>N<sup>246</sup>K<sup>247</sup>D<sup>248</sup>I<sup>249</sup>A<sup>250</sup>A<sup>251</sup>Q<sup>252</sup>L<sup>253</sup>V<sup>254</sup>E<sup>255</sup>R<sup>256</sup>V<sup>257</sup>  
V<sup>258</sup>A<sup>259</sup>A<sup>260</sup>A<sup>261</sup>E<sup>262</sup>T<sup>263</sup>L<sup>264</sup>K<sup>265</sup>V<sup>266</sup>P<sup>267</sup>K<sup>268</sup>V<sup>269</sup>I<sup>270</sup>S<sup>271</sup>P<sup>272</sup>E<sup>273</sup>C<sup>274</sup>G<sup>275</sup>H<sup>276</sup>A<sup>277</sup>F<sup>278</sup>  
T<sup>279</sup>A<sup>280</sup>I<sup>281</sup>R<sup>282</sup>W<sup>283</sup>E<sup>284</sup>G<sup>285</sup>P<sup>286</sup>N<sup>287</sup>L<sup>288</sup>I<sup>289</sup>G<sup>290</sup>R<sup>291</sup>P<sup>292</sup>Y<sup>293</sup>P<sup>294</sup>F<sup>295</sup>K<sup>296</sup>V<sup>297</sup>F<sup>298</sup>H<sup>299</sup>I<sup>300</sup>  
I<sup>301</sup>E<sup>302</sup>V<sup>303</sup>L<sup>304</sup>D<sup>305</sup>E<sup>306</sup>L<sup>307</sup>R<sup>308</sup>A<sup>309</sup>S<sup>310</sup>G<sup>311</sup>R<sup>312</sup>L<sup>313</sup>K<sup>314</sup>T<sup>315</sup>E<sup>316</sup>G<sup>317</sup>M<sup>318</sup>E<sup>319</sup>T<sup>320</sup>D<sup>321</sup>  
R<sup>322</sup>L<sup>323</sup>S<sup>324</sup>M<sup>325</sup>H<sup>326</sup>D<sup>327</sup>P<sup>328</sup>C<sup>329</sup>N<sup>330</sup>L<sup>331</sup>A<sup>332</sup>R<sup>333</sup>K<sup>334</sup>S<sup>335</sup>G<sup>336</sup>V<sup>337</sup>I<sup>338</sup>Q<sup>339</sup>Q<sup>340</sup>Q<sup>341</sup>R<sup>342</sup>  
N<sup>343</sup>L<sup>344</sup>M<sup>345</sup>G<sup>346</sup>L<sup>347</sup>V<sup>348</sup>A<sup>349</sup>E<sup>350</sup>N<sup>351</sup>F<sup>352</sup>V<sup>353</sup>E<sup>354</sup>L<sup>355</sup>K<sup>356</sup>E<sup>357</sup>H<sup>358</sup>G<sup>359</sup>K<sup>360</sup>F<sup>361</sup>Q<sup>362</sup>W<sup>363</sup>  
C<sup>364</sup>C<sup>365</sup>G<sup>366</sup>A<sup>367</sup>G<sup>368</sup>G<sup>369</sup>G<sup>370</sup>V<sup>371</sup>S<sup>372</sup>S<sup>373</sup>N<sup>374</sup>E<sup>375</sup>R<sup>376</sup>A<sup>377</sup>E<sup>378</sup>P<sup>379</sup>L<sup>380</sup>K<sup>381</sup>M<sup>382</sup>A<sup>383</sup>A<sup>384</sup>  
F<sup>385</sup>K<sup>386</sup>R<sup>387</sup>K<sup>388</sup>A<sup>389</sup>Q<sup>390</sup>I<sup>391</sup>E<sup>392</sup>E<sup>393</sup>V<sup>394</sup>S<sup>395</sup>P<sup>396</sup>E<sup>397</sup>R<sup>398</sup>M<sup>399</sup>V<sup>400</sup>T<sup>401</sup>M<sup>402</sup>C<sup>403</sup>A<sup>404</sup>  
T<sup>405</sup>C<sup>406</sup>R<sup>407</sup>T<sup>408</sup>Q<sup>409</sup>L<sup>410</sup>E<sup>411</sup>E<sup>412</sup>G<sup>413</sup>L<sup>414</sup>E<sup>415</sup>E<sup>416</sup>F<sup>417</sup>N<sup>418</sup>M<sup>419</sup>E<sup>420</sup>I<sup>421</sup>P<sup>422</sup>V<sup>423</sup>V<sup>424</sup>G<sup>425</sup>  
L<sup>426</sup>T<sup>427</sup>E<sup>428</sup>M<sup>429</sup>I<sup>430</sup>A<sup>431</sup>E<sup>432</sup>H<sup>433</sup>L<sup>434</sup>V<sup>435</sup>E<sup>436</sup>K<sup>437</sup>N<sup>438</sup>

## 12. ábra: Az Isp2 fehérje konzervált aminosavai

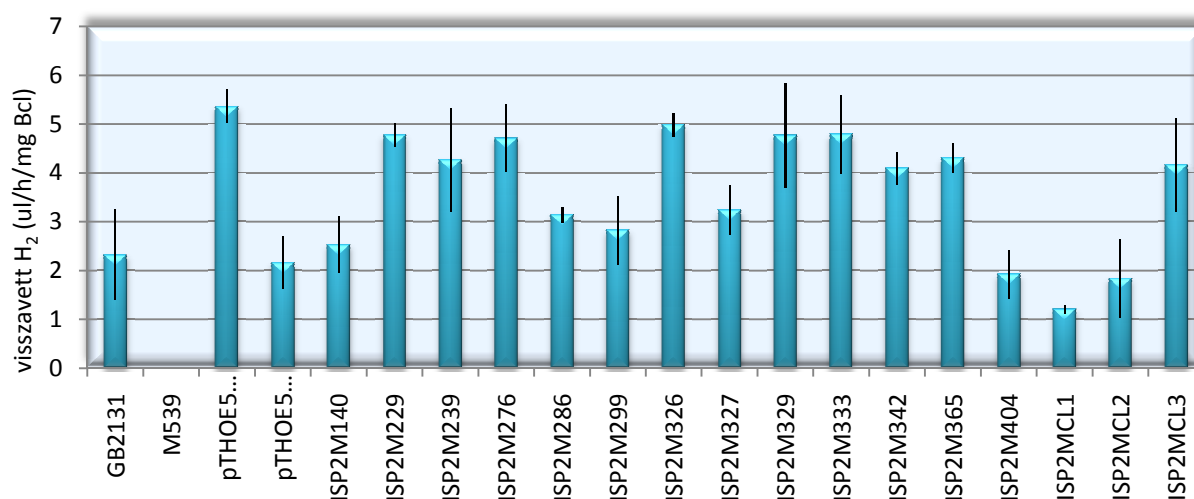
Pirossal jelöltem a pontmutációval kicserélt aminosavakat, piros keret jelöli a csoportosan mutáltatott aminosavakat (CL1, CL2, CL3 mutánsok). A szürke keretben található aminosavak

valószínűleg FeS kocka felépítésében vesznek részt (Hamann és mts. 2007), mint ahogyan az aláhúzott aminosavak is.



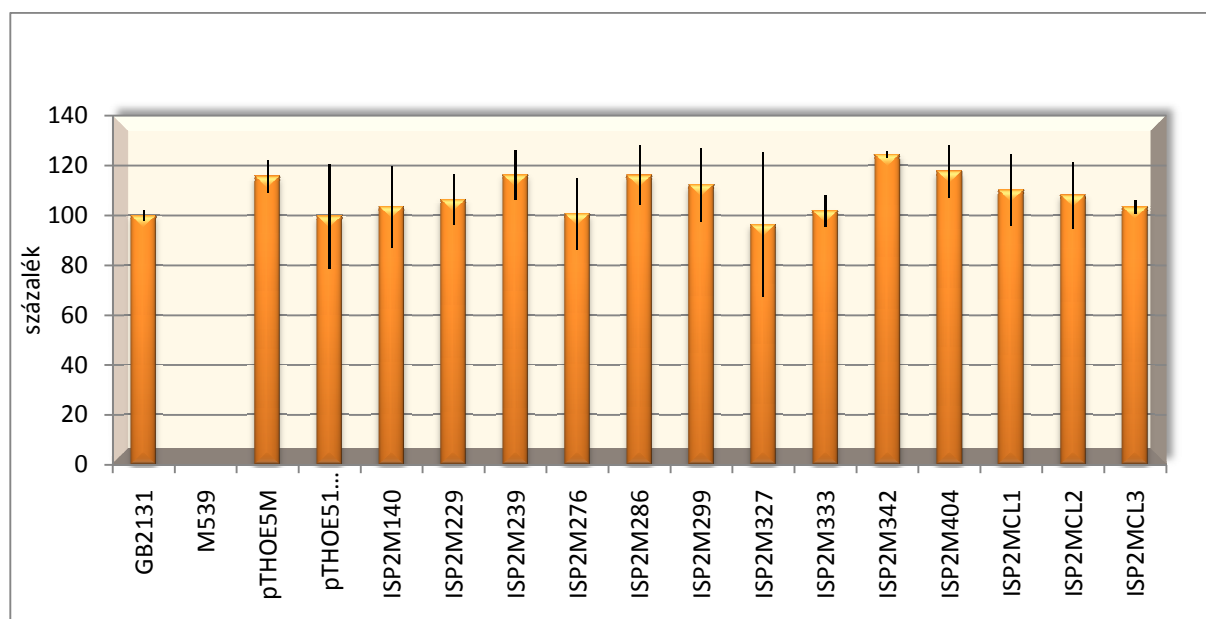
13. ábra: Az *Lsp2* pontmutánsok *in vivo* hidrogéntermelése

A hidrogéntermelési mérések azt mutatják, hogy az 1-es és a 2-es aminosav csoport (ISP2MCL1, ISP2MCL2) mutációja teljesen megszünteti a hidrogén termelést (13. ábra), hasonlóan az ISP12M mutánsnál tapasztalható fenotípushoz. Ugyanezekben a mutánsokban a hidrogén visszavétel mértéke is jelentősen lecsökken, hasonlóan, mint ahogy az *Lsp* fehérjékben mutáns törzs esetén volt tapasztalható (14. ábra).



14. ábra: az *Lsp2* pontmutánsok hidrogén visszavétele *in vivo*.





15. ábra: az Lsp2 pontmutások *in vitro* hidrogén visszavétele

A mutáns aminosavak csoportok tehát esszenciálisak az Lsp2 fehérje, ezáltal pedig a Hyn hidrogenáz *in vivo* aktivitásához is. *In vitro* körülmények között, amikor mesterséges elektron hordozókat alkalmazunk, az aktivitás egyik mutánsnál sem változik. Ez jól megfelel azoknak a megfigyeléseknek, amit az ISP12M mutánssal végzett kísérletek esetén is tapasztaltuk (15. ábra).

Nem minden esetben szűnt meg a Hyn hidrogenáz aktivitása *in vivo* körülmények között, azonban számos aminosav cseréje esetén szignifikánsan csökkent mind a hidrogén termelő, mind pedig a hidrogén visszavevő aktivitás (ISP2M140, ISP2M286, ISP2M299, ISP2M327, ISP2M404). Az *in vitro* aktivitás ezekben a törzsekben sem változott lényegesen.

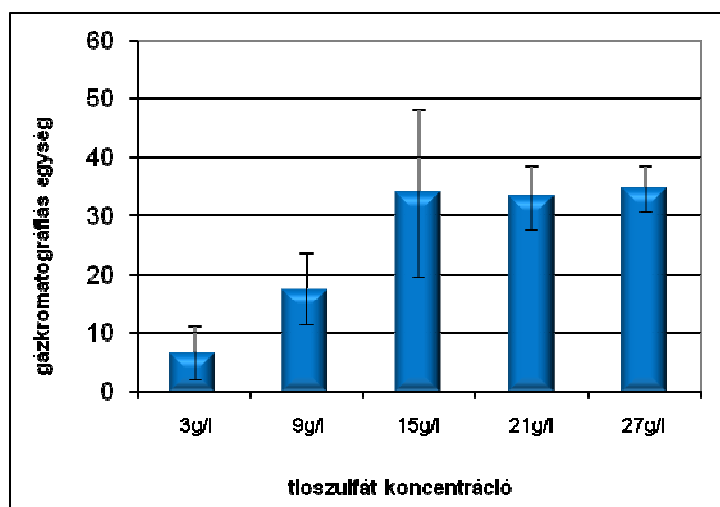
Az Lsp2 -vel homológ fehérjékben mindeddig egyetlen esetben vizsgálták a konzervatív aminosavak szerepét (Hamann és mts. 2007). A *Methanothermobacter marburgensis* heterodiszulfid reduktázának N terminálisán és C terminálisán is található egy CX<sub>31-39</sub>CCX<sub>35-36</sub>CXXC motívum, melyek közül az N-terminális szekvenciában valószínűleg Zn kötőhely található, a C terminális pedig FeS kocka koordinálásában vesz részt. A *T. roseopersicina* Lsp2 fehérjében is megtalálható, azonban csak a C-terminálison a fenti motívum (13. ábra).

Azon aminosavak közül, melyeket *M. marburgiensis*-ben megszüntették a heterodiszulfid FeS

kocka kötő képességét (329, 364, 365, 404) *T. roseopersicina*-ban nem okoztak aktivitásváltozást a Hyn hidrogenázban, tehát valószínűsíthetően nem változtattak az Isp2 FeS kötő képességén.

#### 6.6. A HYN HIDROGENÁZ ÉS A KÉNANYAGCSERE KAPCSOLATA *T. ROSEOPERSICINA* BBS-BEN

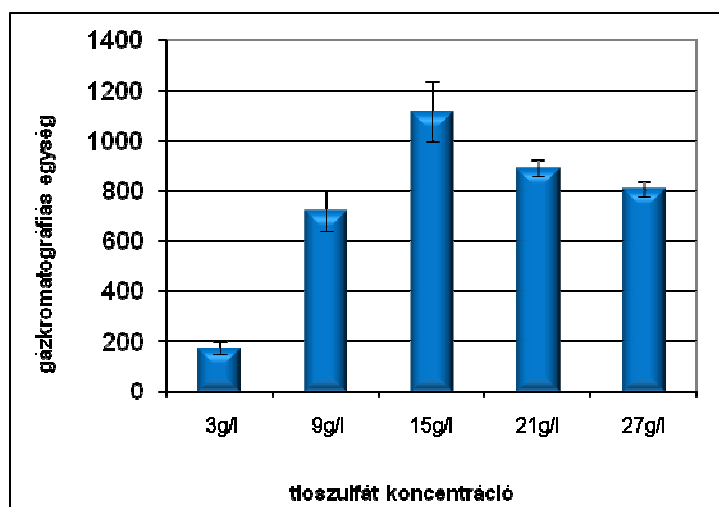
Annak vizsgálatához, hogy a Hyn hidrogenáz aktivitására milyen hatással van a kénvegyületek koncentrációja a tápoldatban, a pTHOE5M törzset különböző koncentrációjú tioszulfát tartalmú tápoldaton növesztettük. A mérések során azt tapasztaltuk, hogy a Hyn hidrogén termelő aktivitása jelentős mértékben megnő, amennyiben nagyobb mennyiségű kénforrás áll rendelkezésre (16. ábra).



16. ábra A GB2131 törzs ( $\text{Hyn}^+$ ) *in vivo* hidrogén termelésének tioszulfát függése

A *T. roseopersicina* Hyn hidrogenázának hidrogén termelő aktivitása tehát megnő, amikor a tápoldatban több kénforrás van jelen, ami bizonyítja azt a feltevést, hogy a Hyn hidrogenáz és a kénanyagcsere kapcsolatban van egymással.

*T. roseopersicina*-ban a hidrogenázok és különböző anyagcsere folyamatok hálózatokat alkotnak. Csoportunk egyik legfontosabb célja ezen útvonalak feltérképezése, egymással illetve a hidrogén metabolizmussal való kapcsolódásuk megértése, statikus és dinamikus metabolikus térkép felállítása. Ezek segítségével jobban megismerhető a hidrogenázok szerepe a sejtekben és lehetővé teszi jobb hidrogén termelő törzsek tervezését, konstrukcióját. A különböző anyagcserefolyamatokban található gének megtalálásához nélkülözhetetlenné vált a *T. roseopersicina* teljes genomszekvenciájának megismerése.



17. ábra. A pTHOE5M törzs (plazmidról termelt HynSL) *in vivo* hidrogén termelésének tioszulfát függése

#### 6.7. A *T. ROSEOPERSICINA* GENOMSZEKVENÁLÁSA

A *Thiocapsa roseopersicina* BBS teljes genomjának szekvenciaanalíziséből az alábbi eredményeket várjuk

- mélyebb betekintést kapunk a sejtek hidrogén metabolizmusába
- jobban megértjük a kulcsenzimek bioszintézisének mechanizmusát
- betekintést nyerünk hidrogenáz enzimek struktúrális-funkcionális tulajdonságainak kapcsolatába
- olyan új anyagcsere utakat fedezünk fel, amelyek befolyással vannak a

#### hidrogéntermelésre

- ezen keresztül a sejtek hidrogéntermelését manipulálni tudjuk
- molekuláris szinten megértjük a nitrogén rögzítés és a hidrogéntermelés közötti kapcsolatot
- átfogó képet kapunk a baktérium fotoszintetikus apparátusáról, folyamatairól
- feltérképezzük és jellemezzük a sejt kénanyagcseréjében szerepet játszó komponenseket

metabolikus szinten megértjük a hidrogén- és kénmetabolizmus közötti kapcsolatot  
tudásbázist szerzünk jobb hidrogén termelő törzsek tervezéséhez, konstrukciójához.

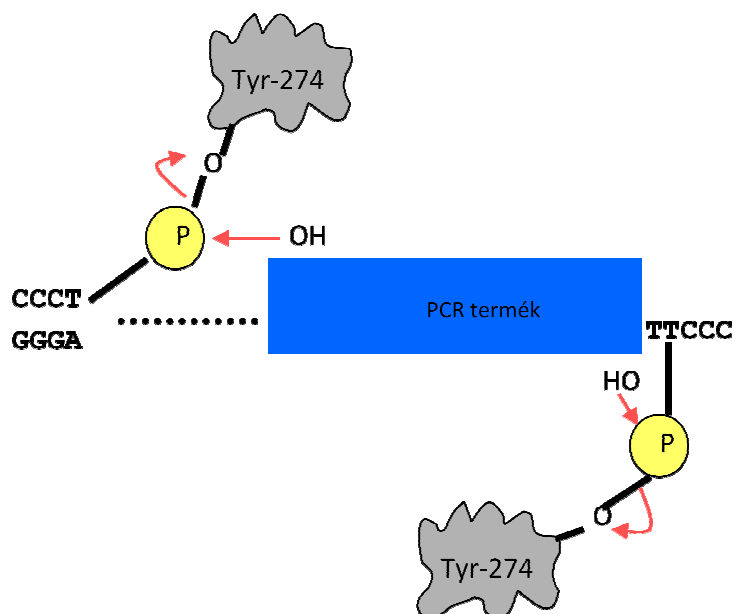
A *T. roseopersicina* teljes genomikai állományának megismeréséhez az úgynevezett hibrid módszert választottuk, mely lényege, hogy többféle módszer kombinálásával jutunk el a teljes genomszekvencia megismeréséig. A különböző módszerekkel nyert szekvenciadarabok ezután bioinformatikai módszerekkel az egymással átfedő szakaszok alapján folyamatos DNS szállá, ún. kontigokká illeszthetőek. A kontigok összeillesztéséből származnak a szuperkontigok, melyek összekapcsolásával végül megkaphatjuk a teljes bakteriális genom szekvenciáját.

#### 6.7.1. KIS GENOMI INSZERTEKET TARTALMAZÓ “SHUTGUN” GENOMI KÖNYVTÁR KÉSZÍTÉSE

Az Invitrogen által forgalmazott TOPO4Blunt klónozó kit lehetővé teszi a polimeráz által kiamplifikált PCR termékek gyors és egyszerű klónozását. A vektor linearizálását *topoizomeráz I*-el végezték el. A *Vaccinia* vírusból származó *topoizomeráz I* specifikusan köti a kettősszálú DNS-t, és egy szálon hasítja minden 5'-CCCTT felismerő motívum után (Schuman, 1991). A foszfodiészter kötés hasítása során felszabaduló energia a 3' foszfátcsoporthoz és a *topoizomeráz I* 274-es helyzetű tirozinjához közti kovalens kötésben konzerválódik. Ezt a kötést támadja meg a ligálás során az inszert DNS 5' hidroxil csoportja, leszorítja a *topoizomeráz*-t a vektorról, és bekötődik a helyére (Schuman, 1994). (18. ábra).

A vektor tartalmaz még egy *ccdB* gént is, amely a *LacZα* C-terminálisához

fúzionáltattak. A vektorba beépülő PCR termék megakadályozza a *LacZ $\alpha$ -*ccdB* fúziós géntermék képződését, így csak a rekombináns plazmidot tartalmazó TOP10 kompetens sejtek élnek túl szélesztés után (Bernhard és mts. 1997). Ez egy ún. pozitív szelekciós módszer.*



**18. ábra: PCR termék klónozása a topoizomeráz I által linearizált vektorba**

A módszer segítségével 12000 klónt állítottam elő, melyek 2- 3 kb-nyi inszertet tartalmaztak. A klónokból 11872-t szekvenáltunk meg mindkét oldalról, amely két különböző kis inszertet tartalmazó könyvtár eredménye. Az átlagos leolvasási hossz 671 bp, a plazmidok átlagos inszertmérete 1 919 bp volt. Az esetek 4,7%-ában az üres vektort szekvenáltuk és összességében a szekvenálások közel 90%-a minden tekintetben megfelelt az elvárásoknak.

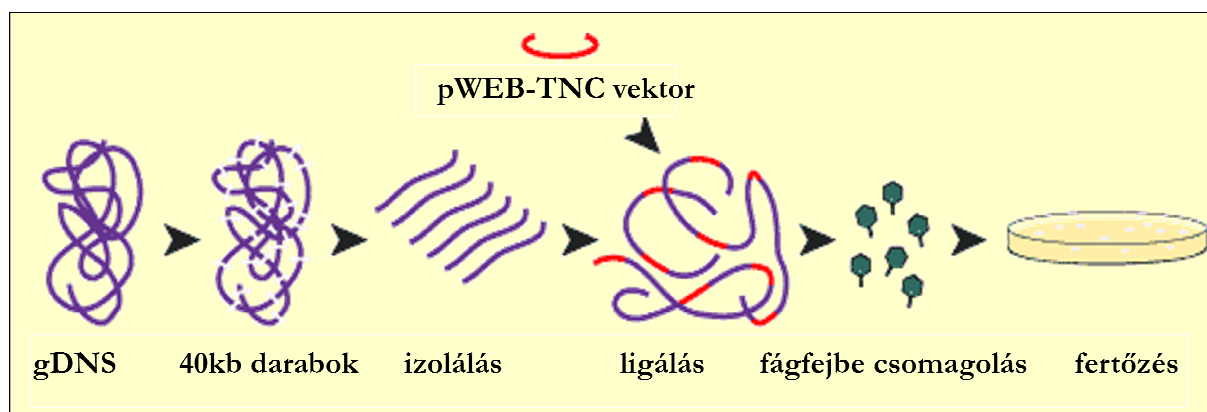
#### 6.7.2. KOZMID KÖNYVTÁR KÉSZÍTÉSE

A shotgun könyvtár kis méretű genomi darabokat tartalmaz, amelyek szekvenciája részlegesen megállapítható két darab, különböző irányú szekvenálással. A szekvenciák összeillesztése azonban általában nem eredményez azonnal egyetlen genom méretű kontigot.

Sok esetben az összefűzés nehézkes, különösen abban az esetben, ha sok ismétlődő szekvenciát tartalmaz a genom. A szekvenciák összeillesztését segítheti olyan könyvtár készítése, amely nagyobb genomi darabokat tartalmaz (BAC, YAC, kozmid).

A kozmid könyvtár készítésének egy kulcskérdése jó minőségű genomi DNS tisztítása, ugyanis csak meghatározott mérettartományba tartozó DNS szakaszok képesek beépülni a kozmid vektorokba, majd pedig a fágfejbe pakolódni. A genomi DNS tisztítás módszerét optimalizáltam és olyan módszert dolgoztam ki, ami lehetővé teszi, hogy a genomi DNS-ből kozmid könyvtárat készítsünk.

Az Epicentre által forgalmazott „pWEB-TNC™ Cosmid Cloning Kit”, Kat. szám: TNC9401) használtam a kozmid könyvtár készítéséhez (19.ábra)



19. ábra: a kozmid könyvtár készítésének modellje

Ezekben a rendszerekben a genomi DNS természetes vagy mesterséges mechanikai töredezettségét kihasználva állítunk elő olyan fragmentumokat, amelyek megfelelő méretűek és minőségűek kozmid könyvtár készítéséhez. A módszerhez optimalizálnom kellett a DNS törésének körülményeit. Három könyvtárat készítettem úgy, hogy a tisztított genomi DNS-t különböző ideig tördeltem (5", 10" és 120") és a fragmentek tompítását követően a vektorban ligáltam. Ezt követően az inszertet tartalmazó kozmidokat *in vitro* fágfehérjékbe csomagoltam és az így kapott mesterséges fágokkal sejteket fertőztünk. A legjobb könyvtárból több, mint 7000, a legrosszabból is legalább 2000 klónt kaptam. A klónokból DNS-t tisztítottam (ezt a lépést a nagy inszertméret miatt külön optimalizálni kellett) és az így kapott vektorokat emésztettem. Megállapítottam, hogy az inszertek méreteloszlása megfelelő (33- 35 kbp) illetve

nem kaptunk redundáns klónokat, amelyek ugyanolyan mintázatot adtak volna. Ez alapján a három könyvtárból összességében 4000 klónt választottam ki, melyekből összesen 3406 kozmid klón szekvenciáját határoztuk meg mindkét oldalról. Ezeket a szokásos módon számítógéppel feldolgoztuk és a meglévő kontigokat segítségükkel nagyobb kontigokká illetve genom vázként (scaffoldként) rendeztük.

### **6.7.3. 454 SZEKVENÁLÁS**

A 454 cég által kifejlesztett piroszekvenáláson alapuló technológia, melyet 2007-ben a Roche felvásárolt. A módszer egyedül nem alkalmas teljes genomok meghatározására, de a Sanger féle shotgun szekvenálásokkal kombinálva viszonylag gyorsan és gazdaságosan lehet teljes genomokat megszekvenálni. A rendszer teljesen automatizált és bár csak rövid, 100-200 bp hosszú szakaszokat képes leolvasni, viszont ezeket kontigokba rakja. A 454 szekvenálás összességében 113 Mbp szekvenciát eredményezett, ami a genom becsült mérete alapján 22,5-szeres lefedettséget jelent.

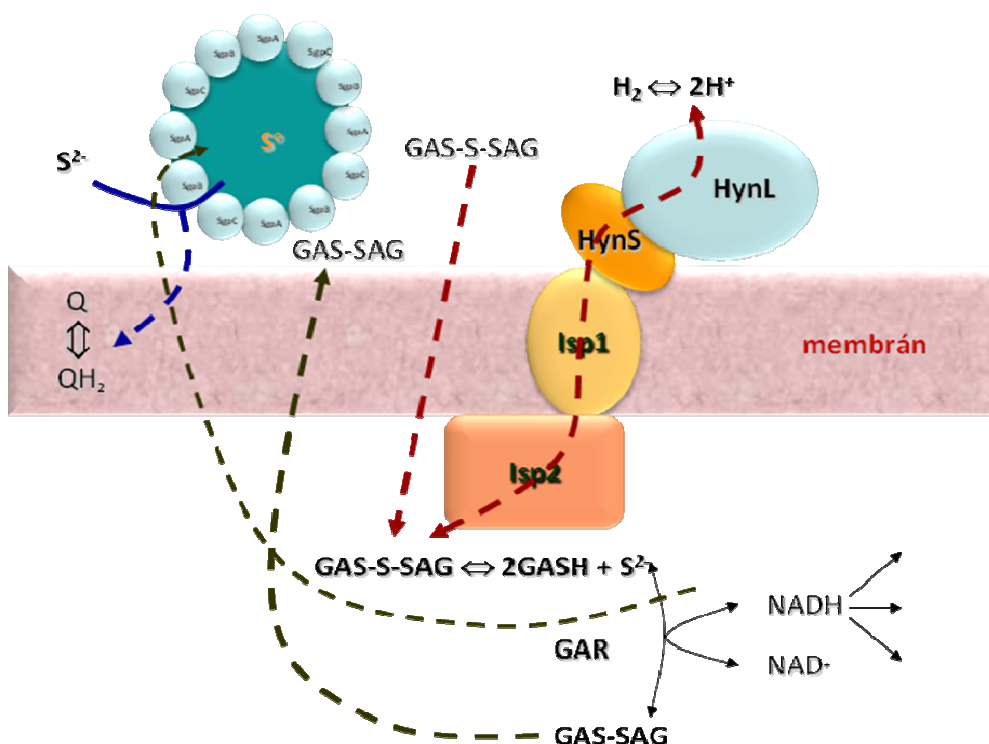
### **6.7.4. A HIBRID GENOMSZEKVENÁLÁSSAL KAPOTT EREDMÉNYEK**

A fenti módszerek kombinációjával összességében 5 388 018 bp szekvencia állt rendelkezésre, mely kicsit több, mint 200 kontigba volt szervezhető, a kontigok pedig 23 scaffoldon helyezhetők el. A leghosszabb kontig mérete 0,5 Mbp, a leghosszabb scaffoldé pedig 1,3 Mbp. Ez utóbbi lényegében a genom 25 %-ának felel meg. A Sanger szekvenciák 3,20-szeresen, a 454/piroszekvenciák 22,52-szeresen fedik le a genomot. A plazmidok átlagos inszertmérete 1 919 bp, míg a kozmidoké 35 702 bp. Azok a kozmidok, amelyeket megszekvenáltuk, közel tízszeresen (9,56) fedik le a genomot.

A projekt befejezését a teljes genom összeillesztése jelentené, jelenleg mintegy 1-200 feltöltendő lyukkal számolunk ( $< 1000 \text{ bp/lyuk} \Rightarrow 100 \text{ kbp}$ ). Ez kevesebb, mint 2%-a a pillanatnyilag rendelkezésre álló szekvenciának, ami azt jelenti, hogy a genom 98%-át a fenti hibrid megközelítéssel meg tudtuk határozni.

### 6.7.5. GÉNEK AZONOSÍTÁSA A GENOMBAN

Bár a *T. roseopersicina* teljes genomszekvenciáját még nem ismerjük, a rendelkezésre álló temérdek szekvenciában is lehetőség volt olyan géneket keresni, amelyek a munkánkat közvetlenül segítették. A homológ fehérjék szekvenciái alapján tervezett primerekkel a kozmid könyvtárban sikerült megtalálni több, régen keresett gén szekvenciáját, közöttük az összes gént, ami a hidrogenáz bioszintézisében vesz részt, az acetát, a kén és nitrogénmetabolizmusban potenciálisan szerepet játszó géneket.



**20. ábra: A Hyn hidrogenáz és a kénanyagcsere kapcsolatának modellje**

Mivel a Hyn hidrogenáz Isp2 alegysége homológiát mutat a heterodiszulfid redukázokkal, ezért modellünk szerint a fehérjének heterodiszulfid típusú redox partnere lehet. A fototróf bíbor kénbaktériumok nem tartalmazzák a klasszikus CoM-S-S-CoB



szubsztrátot, ezért alternatív heterodiszulfid típusú redox hordozót kerestünk. Bartsch és mtsai. (1996) valamint Pott és Dahl (1998) munkássága alapján valószínűsíthető egy glutation amid (GA) típusú, különböző oxidáltsági állapotban (GASH/GASSGA/GASSSGA) előforduló redox hordozó az Allochromaticaeae rendhez tartozó számos baktériumokban. Ennek pontos szerepét még nem tisztázták. A glutation-amidot a glutation-amid reduktáz diszulfid formává alakítja (GASSAG), miközben NADH szabadul fel (Vergauwen és mts., 2001). Ez a homodiszulfid visszakerülve a periplazmába heterodiszulfiddá alakul. A *T. roseopersicina* genomjában azonosítottuk a glutation amid reduktáz génjét, ami alapján valószínű, hogy ez a redox peptid jelen van ebben a törzsben is. Ezek alapján elképzelhető, hogy az Isp2-nek a glutation amid valamelyik formája lesz a szubsztrátja. A modell szerint kénglobulusokból a periplazmában keletkező GA(SSS)GA a citoplazmába transzportálódik, majd az Isp2 fehérje perszulfidra két glutation amidra hasítja (GASH) és kénhidrogén szabadul fel. A kozmid könyvtárban megtalált *gar* operon szerepének pontos bizonyítása deléciós mutagenézissel lehetséges, amely jelenleg már zajlik laborunkban.

Az Isp2 fehérje homológiát mutat a DsrK fehérjével, amely azonban megtalálható a genomban a *dsrABEFHCMKLJ* operonban kódolva. A DsrM pedig b-típusú hem kötőhellyel rendelkezik csakúgy, mint az Isp1. Feltehetően a két rendszer hasonlóan működik azzal a különbséggel, hogy míg a DsrK által termelt és a DsrM által szállított elektron a legújabb adatok szerint a kinon raktárba jut, addig az Isp1 a Hyn hidrogenáznak adja le a bontásból származó elektront, ami így hidrogéntermelődéssé fordítódik.

A genomszekvencia alapján a kénanyagcsere modelljének megállapítása már megtörtént, számos olyan gént sikerült azonosítani, melyek részt vesznek a *T. roseopersicina* hidrogén-, illetve kénanyagcseréjében. A fenti modell bizonyítása pedig már egy következő doktori disszertáció témája lesz majd csoportunkban.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A Hyn hidrogenáz génelrendeződése a többi [NiFe] hidrogenáz operonjától eltérő, a kis alegység és a nagy alegység génje között ugyanis két nyitott leolvasási keret található, az *isp1* és *isp2*.

Munkám során ezen két potenciális gén, illetve termékeinek a Hyn hidrogenázzal való kapcsolatát tanulmányoztam. A Hyn hidrogenáz kiemelkedő stabilitási tulajdonságokkal rendelkező membránkötött enzim, amely mind hidrogén termelő, mind hidrogén felvevő irányban képes működni.

Kísérleteim eredményei a következők:

- I. RT-PCR segítségével bizonyítottam, hogy a *Thiocapsa roseopersicina* genomjában egymás mellett található *hynS-isp1-isp2-hynL* gének egy operont alkotnak.
- II. Expressziós analízis segítségével bizonyítottam, hogy a kis alegység és a nagy alegység közé beékelődött két gén valódi fehérjéket kódolnak.
- III. A *hynS* gén előtt felfedeztem egy gént (*hynH*), amelynek fehérje terméke szerepet játszhat a Hyn hidrogenáz érésében és transzlokációjában.
- IV. Heterológ gazdában, *Escherichia coli*-ban túltermeltettem az Isp2 fehérjét. A fehérjéhez fúzionáltatott His-tag segítségével fémkelátoló affinitás kromatográfiával tisztítottam. A fehérje termeltetését különböző hőmérsékleten próbáltam, azonban mivel minden esetben oldhatatlan formátumot alkotott *E. coli*-ban, a tisztítását denaturáló körülmények között végeztem.
- V. Az Isp1, Isp2 fehérjék funkciójának vizsgálata érdekében kromoszomális mutánsokat készítettem, melyekben az Isp1 fehérje, valamint az Isp1 és az Isp2 génjét egyaránt inaktiváltam. A mutánsokon végzett aktivitás mérések

eredményeképpen megállapítottam, hogy az Isp1,2 fehérjékre szükség van a Hyn hidrogenáz fiziológias aktivitásához. Ezáltal bizonyítást nyert, hogy az Isp1, Isp2 fehérjék *in vivo* funkciója a Hyn hidrogenázhoz kapcsolódik.

- VI. Különböző sejtfrakciókon végzett aktivitás mérések segítségével bizonyítottam, hogy az Isp fehérjék mutációja nem befolyásolja a Hyn hidrogenáz lokalizációját, az enzim a membránban marad akkor is, ha az Isp fehérjék nincsenek jelen a sejtekben, az Isp fehérjéknek tehát nincs membránhoz kötő szerepük a Hyn hidrogenáz esetén.
- VII. Az Isp2 fehérjében található konzervatív aminosavakat pontmutációval kicseréltem egy más karakterű aminosavra, megvizsgáltam, hogy az egyes aminosavaknak milyen hatása van a Hyn aktivitására. Megállapítottam, hogy vannak olyan aminosavak, melyek mutációja megszünteti vagy lecsökkenti a Hyn hidrogenáz aktivitását. Ezek a kísérletek további bizonyítékként szolgálnak a két fehérje funkcionális kapcsoltságára.
- VIII. Tanulmányoztam a Hyn hidrogenáz és a kénanyagcsere kapcsolatát, megállapítottam, hogy a tápoldat tioszulfát koncentrációjának növekedése befolyásolja a Hyn hidrogenáz hidrogén termelését, ami bizonyíték arra, hogy a Hyn és a kénanyagcsere *T. roseopersicina*-ban kapcsolatban van egymással.
- IX. A *T. roseopersicina* genomszekvenálásához “shutgun” és kozmid könyvtárakat készítettem. 30556 db Sanger típusú szekvenciát kombináltuk az új generációs 454 technológiával. Ennek az ún. hibrid genomszekvenálási stratégia segítségével a *T. roseopersicina* genomszekvenciájának 98%-a ismertté vált.
- X. A kozmid könyvtárban azonosítottam többek között a glutation-amid reduktázt kódoló géneket. A glutation-amid reduktáz olyan enzim, amely kapcsolatot biztosíthat a Hyn hidrogenáz és a kénanyagcsere között.

## 8. SUMMARY

Gene arrangement of the operon of Hyn hydrogenase in *Thiocapsa roseopersicina* is unusual because there are two open reading frames (*isp1*, *isp2*) between the genes of the small and the large subunit.

In my work the functional linkage of the Isp1 and Isp2 proteins to the Hyn hydrogenase was studied. The Hyn is an extrem stable, membrane-bound enzyme which can evolve and uptake hydrogen under *in vivo* conditions.

The following results were obtained from my studies:

- I. Using RT-PCR analysis I have demonstrated that the *hynS-isp1-isp2-hynL* genes are located on a single transcript they are transcriptionally coupled.
- II. Applying T7 expression system I have proved that *isp1* and *isp2* genes codes for real proteins.
- III. I have found a gene upstream from the *hynS* gene (*hynH*) which likely codes for a accessory protein involved in the maturation and transport of the Hyn.
- IV. I have overproduced the Isp2 protein in heterologous host (*E. coli*). I have purified the protein with affinity-chromatography via a His-Tag phusion partner.
- V. In order to examine the function of the Isp1 and Isp2, I made several genomic mutants in which the Isp1 (ISP1M) and the Isp1 together with Isp2 (ISP12M) were deleted. Biochemical characterization of the *in vivo* and *in vitro* Hyn hydrogenase activities of the mutant strains showed, that the Isp proteins are essential to the proper *in vivo* activity of Hyn. Hereby, I confirmed that the Isp1 and Isp2 proteins are in functional association with Hyn hydrogenase.

- VI. The localization of the Hyn hydrogenase in the absence of the Isp proteins has been examined. I have found that deletion of the Isp1 and Isp1-2 had no effect of the localization of the Hyn hydrogenase. According to these results the Isp proteins had no membrane-anchoring role for the Hyn enzyme.
- VII. Several conserved amino acids between the Isp2 and its homologous proteins have found. Applying site directed point mutagenesis, I have changed these amino acids to a residue with completely different property. I have identified few residues which had important or essential role in the in vivo Isp2 driven Hyn hydrogenase activity.
- VIII. I have demonstrated a relationship between the thiosulphate content in the growing media and the hydrogen producing activity of the Hyn. This is an evidence for connection between the Hyn hydrogenase and sulfur metabolism.
- IX. I have made genomic libraries from *T. roseopersicina* for determination the genomic sequence. The next generation 454 method was combined with 30556 sequencing reads obtained from these libraries by the Sanger method. This hybrid approach yielded around 98% of the *T. roseopersicina*'s total genome.
- X. I have identified numerous genes likely involved in the hydrogen and sulfur metabolism. The gene of the glutathion-amide reductase provoked special interest since this enzyme might be a component of metabolic context of the Hyn hydrogenase related to the sulfur metabolism and  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  housekeeping.

## **9. KÖZLEMÉNYEK**

### **A dolgozat alapjául szolgáló közlemény**

**Palágyi-Mészáros LS, Maróti J, Latinovics D, Balogh T, Klement E, Medzihradszky KF, Rákhely G, Kovács KL.** (2009) Electron-transfer subunits of the NiFe hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. FEBS J. 276:164-74.

### **Egyéb közlemények**

**Kovács AT, Rákhely G, Balogh J, Maróti G, Cournac L, Carrier P, Mészáros LS, Peltier G, Kovács KL.** (2005) Hydrogen independent expression of hupSL genes in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. FEBS J. 272:4807-16.

**Kovács KL, Kovács AT, Maróti G, Mészáros LS, Balogh J, Latinovics D, Fülöp A, Dávid R, Dorogházi E, Rákhely G.**(2005) The hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina*. Biochem Soc Trans. 33:61-3.

**Fodor BD, Kovács AT, Csáki R, Hunyadi-Gulyás E, Klement E, Maróti G, Mészáros LS, Medzihradszky KF, Rákhely G, Kovács KL.**(2004) Modular broad-host-range expression vectors for single-protein and protein complex purification. Appl Environ Microbiol. 70:712-21.

**Kovács KL, Kovács ÁT, Maróti G, Bagi Z, Csanádi Gy, Perei K, Bálint B, Balogh J, Fülöp A, Mészáros LS, Tóth A, Dávid R, Latinovics D, Varga A, Rákhely G.** (2004) Improvement of biohydrogen production and intensification of biogas formation. Reviews in Environmental Science & Bio/Technology 3: 321–330.

## **10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki segített abban, hogy ezen munka elkészülhessen:

Családom minden tagjának, akik mindig hittek bennem, minden körülmények között szerettek és mellettem álltak.

Témavezetőimnek:

**Dr. Rákhely Gábornak**

a rengeteg szakmai tanításért, ötleteiért emberségéért és állandó jóindulatáért,

**Professzor Kovács Kornélnak**

amiért megteremtette a feltételeket a csoport zökkenőmentes működéséhez.

Köszönet illeti csoportom összes munkatársát, különösen

**Fodor Barnát**

aki elindított ezen az úton és az alapvető szakmai instrukciók mellett emberileg is példaképpé vált,

**Maróti Juditot**

barátságáért, a szakmai diskurzusokért és eszmecserékért,

**Tengölics Rolandot**

barátságáért, hatalmas ötleteiért és mindent elsöprő lelkesedéséért,

**Győri Editet, Dányi Istvánt, Szabó Enikőt és Csata Tündét**

fáradhatatlan és lelkes munkájukért, valamint

**Kovács Ákost**

az izotópos munkákban nyújtott segítségért.

## 11. HIVATKOZÁSOK LISTÁJA

**Adams, M.W., L.E. Mortenson, J.S. Chen** (1980). Hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **594**:105-176.

**Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.

**Armstrong F.A., Belsey N.A., Cracknell J.A., Goldet G., Parkin A., Reisner E., Vincent K.A., Wait AF** (2009) Dynamic electrochemical investigations of hydrogen oxidation and production by enzymes and implications for future technology. *Chem Soc Rev.* **38** :36-51.

**Bagyinka C, Kovács K.L., Rak E.** (1982) Localization of hydrogenase in *Thiocapsa roseopersicina* photosynthetic membrane. *Biochem J.* **202**:255-8.

**Bartsch, R.G., G.L. Newton, C. Sherrill, R.C. Fahey** (1996) Glutathione amide and its perthiol in anaerobic sulfur bacteria. *J. Bacteriol.* **178**:4742-6.

**Batut J., P. Boistard.** (1994) Oxygen control in *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**:129-150.

**Benemann, J.** (1996) Hydrogen biotechnology: progress and prospects. *Nat. Biotechnol.* **14**:1101-1103.

**Berks, B.C., F. Sargent, E. De Leeuw, A.P. Hinsley, N.R. Stanley, R.L. Jack, G. Buchanan, T. Palmer.** (2000) A novel protein transport system involved in the biogenesis of bacterial electron transfer chains. *Biochim Biophys Acta.* **1459**:325-30.

**Bernhard, M., B. Benelli, A. Hochkoeppler, D. Zannoni, B. Friedrich.** (1997) Functional and structural role of the cytochrome b subunit of the membrane-bound hydrogenase complex of



*Alcaligenes eutrophus* H16. *Eur. J. Biochem.* **248**:179-186.

**Bogorov, LV.** (1974). [The properties of *Thiocapsa roseopersicina*, strain BBS, isolated from an estuary of the White Sea]. *Mikrobiologiya* **43**:326-332.

**Brown, T.A.** (2002) Genomes, New York and London: Garland Science

**Buhrke, T., O. Lenz, A. Porthun, B. Friedrich.** (2004) The H<sub>2</sub>-sensing complex of *Ralstonia eutropha*: interaction between a regulatory [NiFe] hydrogenase and a histidine protein kinase. *Mol Microbiol.* **51**:1677-89.

**Bui, E. T., P. J. Johnson** (1996). Identification and characterization of [Fe]-hydrogenases in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **76**:305-310.

**Burgdorf, T., S. Loscher, P. Liebisch, E. Van der Linden, M. Galander, F. Lendzian, W. Meyer-Klaucke, S. P. Albracht, B. Friedrich, H. Dau, M. Haumann** (2005) Structural and Oxidation-State Changes at Its Nonstandard Ni-Fe Site during Activation of the NAD-Reducing Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* Detected by X-ray Absorption, EPR, and FTIR Spectroscopy. *J Am Chem Soc.* **127**:576-592.

**Cammack R., V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian** (1994) Nickel-iron hydrogenase. *Meth. Enzymol.* **243**: 43-68.

**Cammack, R., M. Freyand, R. Robson.** (2001) Hydrogen as a fuel. Taylor & Francis Inc., London and New York.

**Casalot, L., M. Rousset.** (2001) Maturation of the [NiFe] hydrogenases. *Trends Microbiol.* **9**:228-237.

**Colbeau, A., K. L. Kovács, J. Chabert, P. M. Vignais.** (1994) Cloning and sequencing of the structural (*hupSLC*) and accessory (*hupDHI*) genes for hydrogenase biosynthesis in *Thiocapsa*

*roseopersicina. Gene* **140**:25-31.

**Dahl, C., G. Rákhely, A. S. Pott-Sperling, B. Fodor, M. Takács, A. Tóth, M. Kraeling, K. Gyórfi, Á. Kovács, J. Tusz, and K. L. Kovács.** (1999) Genes involved in hydrogen and sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**:317-324.

**Dubini, A., F. Sargent.** (2003) Assembly of Tat-dependent [NiFe] hydrogenases: identification of precursor-binding accessory proteins. *FEBS Lett.* **549**:141-146.

**Fodor B, Rákhely G, Kovács AT, Kovács KL.** (2001) Transposon mutagenesis in purple sulfur photosynthetic bacteria: identification of hypF, encoding a protein capable of processing [NiFe] hydrogenases in alpha, beta, and gamma subdivisions of the proteobacteria. *Appl Environ Microbiol.* **67**:2476-83,.

**Elsen, S., A. Colbeau, A. Chabert, P. M. Vignais.** (1996) The *hupTUV* Operon Is Involved in Negative Control of Hydrogenase Synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **78**: 5174-5181.

**Fleischmann, R.D., M.D. Adams, O. White, és munkatársaik** (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512.

**Fodor BD, Kovács AT, Csáki R, Hunyadi-Gulyás E, Klement E, Maróti G, Mészáros LS, Medzihradszky KF, Rákhely G, Kovács KL.** (2004) Modular broad-host-range expression vectors for single-protein and protein complex purification. *Appl Environ Microbiol.* **70**:712-21.

**Fontecilla-Camps, J. C., M. Frey, E. Garcin, C. Hatchikian, Y. Montet, C. Piras, X. Vernede, A. Volbeda.** (1997) Hydrogenase: a hydrogen-metabolizing enzyme. What do the crystal structures tell us about its mode of action? *Biochimie*, **79**: 661-6.

**Forestier, M.; P. King, L. Zhang, M. Posewitz, S. Schwarzer, T. Happe, M. Ghirardi, L. Seibert.** (2003) Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic

conditions. *Eur. J. Biochem.* **270**: 2750-8.

**Frangeul, L., Nelson, K.E., Buchrieser, C., Danchin, A., Glaser, P., Kunst, F.** (1999) Cloning and assembly strategies in microbial genome projects. *Microbiology* **145**: 2625-2634.

**Fraser, C.M., Fleischmann, R.D.** (1997) Strategies for whole microbial genome sequencing and analysis. *Electrophoresis* **18**: 1207-1216.

**Fritsche E, E.; A. Paschos, H. G. Beisel, A. Böck, R. J. Huber.** (1999) Crystal structure of the hydrogenase maturing endopeptidase HYBD from *Escherichia coli*. *J. Mol.Biol.* **288**: 989-98.

**van Gastel M, C. Fichtner, F. Neese, W. Lubitz.** (2005) EPR experiments to elucidate the structure of the ready and unready states of the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Biochem Soc Trans.* **33**:7-11.

**Ghirardi ML, M.C. Posewitz , P.C. Maness , A. Dubini , J. Yu , M. Seibert .**(2007) Hydrogenases and hydrogen photoproduction in oxygenic photosynthetic organisms. *Annu Rev Plant Biol.***58**:71-91.

**Gogotov, I.N., N.A. Zorin, E.N. Kondratieva.** (1976) [Purification and properties of hydrogenase from phototrophic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*]. *Biokhimiia*. **41**:836-842.

**Green, E.D.** (2001) Strategies for the systematic sequencing of complex genomes. *Nature Rev Genetics* **2**: 573-582

**Hanczár T., Csáki R., Bodrossy L., J. C. Murrell, Kovács K. L.** (2002) Detection and localization of two hydrogenases in *Methylococcus capsulatus* (Bath) and their potential role in methane metabolism. *Arch Microbiol.* **177**:167-172.

**Happe, T., A. Hemschemeier, M. Winkler, A. Kaminski.** (2002) Hydrogenases in green algae: do they save the algae's life and solve our energy problems? *Trends Plant Sci.* **7**:246-250.

**Happe, R. P. , W. Roseboom, G. Egert, C. G. Friedrich, C. Massanz, B. Friedrich, S. P. Albracht.** (2000) Unusual FTIR and EPR properties of the H<sub>2</sub>-activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *FEBS Lett.* **466**: 259-63.

**Hartmann, G. C., A. R. Klein, M. Linder, R. K. Thauer.** (1996) Purification, properties and primary structure of H<sub>2</sub>-forming N<sub>5</sub>,N<sub>10</sub>-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanococcus thermolithotrophicus*. *Arch Microbiol.* **165**:187-93.

**Hensen, D., D. Sperling, H.G Trüper, D.C. Brune and C. Dahl** (2006). Thiosulphate oxidation in the phototrophic sulphur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Mol. Microbiol.* **62**:792-810.

**Herrero, M., V. Lorenzo, K. N. Timmis.** (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6557-6567.

**Inoue, H., H. Nojima, H. Okayama** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-28.

**Kim, H., R. J. Maier.** (1990) Transcriptional regulation of hydrogenase synthesis by nickel in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* **265**:18729-18732.

**Kondratieva, E. N., V. G. Zhukov, R. N. Ivanovsky, U. P. Petushkova, E. Z. Monosov.** (1976) The capacity of phototrophic sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* for chemosynthesis. *Arch. Microbiol.* **108**:287-292.

**Kovács, K.L., C. Bagyinka, G. Tigyi.** (1988) Proteolytic resistance and its utilization in purification of hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochim. Biophys. Acta* **935**:166-172.

**Kovács K.L., Bagyinka C.** (1990) Structural properties, functional states and physiological roles of hydrogenase in photosynthetic bacteria *FEMS Microbiol. Reviews* **87**: 407-41.

**Kovács K.L., Fodor B.D., Kovács Á.T., Csanádi G., Maróti G., Balogh J., Arvani S., Rákhely, G.** (2002) Hydrogenases, accessory genes and the regulation of [NiFe] hydrogenase biosynthesis in *Thiocapsa roseopersicina*. *Int J Hydrogen Energy* **27**:1463-1469.

**Kovács A.T., Rákhely G., Kovács K.L.** (2003) Genes involved in the biosynthesis of photosynthetic pigments in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Appl Environ Microbiol.* **69**:3093-102.

**Kovács K.L., Kovács Á.T., Maróti G., Mészáros L.S. Balogh J., Latinovics D., Fülöp A., Dávid R., Dorogházi E., Rákhely, G.** (2005) The hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochemical Society Transactions* **33**: 61-63.

**Kurkin, S., S.J. George, R.N. Thorneley, S.P. Albracht.** (2004) Hydrogen-induced activation of the [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum* as studied by stopped-flow infrared spectroscopy. *Biochemistry.* **43**:6820-31.

**Laska, S., F. Lottspeich, A. Kletzin.** (2003) Membrane-bound hydrogenase and sulfur reductase of the hyperthermophilic and acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. *Microbiology* **149**: 2357-2371.

**Laurinavichene, T.V., Rákhely G., Kovács K.L., Tsygankov A.A.** (2007) The effect of sulfur compounds on H<sub>2</sub> evolution/consumption reactions, mediated by various hydrogenases, in the purple sulfur bacterium, *Thiocapsa roseopersicina*. *Arch Microbiol.* **188**:403-10.

**Lenz, O, B. Friedrich.** (1998) A novel multicomponent regulatory system mediates H<sub>2</sub> sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**:12474-9.

**Lenz, O, M. Bernhard, T. Buhrke, E. Schwartz, B. Friedrich.** (2002) The hydrogen-sensing apparatus in *Ralstonia eutropha*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**:255-262.

**Lu, J, Rákhely G., Kovács K.L., C. Xiao, P. Zhou.** (2001) Identification and cloning of partial *mbh2* gene cluster of hyperthermophile *Aquifex pyrophilus*. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **41**, 674-679.

**Manyani, H., L. Rey, J.M. Palacios, J. Imperial, T. Ruiz-Argüeso.** (2005) Gene Products of the *hupGHJ* Operon Are Involved in Maturation of the Iron-Sulfur Subunit of the [NiFe] Hydrogenase from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Journal of Bacteriology*, **187**: 7018–7026.

**Moy, R.** (2003) Liability and the hydrogen economy. *Science* **301**:47.

**Palágyi-Mészáros L.S., Maróti J., Latinovics D., Balogh T., Klement E., Medzihradszky K.F., Rákhely G., Kovács K.L.** (2009) Electron-transfer subunits of the NiFe hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *FEBS J.* **276**:164-74.

**Palmer, T., F. Sargent, B.C. Berks.** (2005) Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol.* **13**:175-80.

**Pimentel, D.** (1991) Global warming, population growth, and natural resources for food production. *Soc. Nat. Resour.* **4**:347-363.

**Posewitz, M.C., P.W. King, S.L. Smolinski, L. Zhang, M. Seibert, M.L. Ghirardi.** (2004) Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. *J Biol Chem.* **279**:25711-20.

**Pfennig, N., H.G. Trüper.** 1991. The family Chromatiaceae, p. 3200-3221. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

**Pott, A.S., C. Dahl** (1998). Sirohaem sulfite reductase and other proteins encoded by genes *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiology*, **144**:1881-1894.

**Prange, A., H. Engelhardt, H.G. Truper and C. Dahl (2004).** The role of the sulfur globule proteins of *Allochromatium vinosum*: mutagenesis of the sulfur globule protein genes and expression studies by real-time RT-PCR. *Arch. Microbiol.* **182**:165–174.

**Rákhely G., A. Colbeau, J. Garin, P.M. Vignais, Kovács, K. L. (1998)** Unusual organization of the genes coding for HydSL, the stable (NiFe) hydrogenase in the photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *J. Bacteriol.* **180**:1460-1465.

**Rákhely G., Kovács Á.T., Maróti G., Fodor B.D., Csanádi G., Latinovics D. Kovács K. L. (2004)** Cyanobacterial type, heteropentameric, NAD<sup>+</sup> reducing [NiFe] hydrogenase in the purple sulfur photosynthetic bacterium, *Thiocapsa roseopersicina*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:722-728.

**Rákhely G., T.V. Laurinavichene, A.A. Tsygankov, Kovács K.L. (2007)** The role of Hox hydrogenase in the H<sub>2</sub> metabolism of *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochim Biophys Acta.* **1767**:671-6.

**Rodrigue, A., N. Batia, M. Müller, O. Fayet, R. Bohm, M. A. Mandrand-Berthelot, Wu L. F. (1996)** Involvement of the GroE chaperonins in the nickel-dependent anaerobic biosynthesis of NiFe-hydrogenases of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:4453-4460.

**Sander, J., S. Engels-Schwarzlose, C. Dahl (2006).** Importance of the DsrMKJOP complex for sulfur oxidation in *Allochromatium vinosum* and phylogenetic analysis of related complexes in other prokaryotes. *Arch. Microbiol.* **186**:357–366.

**Sauter, M., R. Bohm, A. Böck. (1992)** Mutational analysis of the operon (*hyc*) determining hydrogenase 3 formation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **6**:1523-32.

**Sargent, F., B.C. Berks, T. Palmer. (2002)** Assembly of membrane-bound respiratory complexes by the Tat protein-transport system. *Arch. Microbiol.* **178**:77-84.

**Sawers, R. G., S. P. Ballantine, D. H. Boxer.** (1985) Differential expression of hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli* K-12: evidence for a third isoenzyme. *J. Bacteriol.* **164**:1324-1331.

**Sawers, R. G., D. H. Boxer.** (1986) Purification and properties of membrane-bound hydrogenase isoenzyme 1 from anaerobically grown *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* **156**:265-275.

**Schafer, A., A. Tauch, W. Jager, J. Kalinowski, G. Thierbach, Pühler, A.** (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**:69-73.

**Schmitz, O., G. Boison, R. Hilscher, B. Hundeshagen, W. Zimmer, F. Lottspeich, H. Bothe** (1995) Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. *Eur J Biochem.* **233**:266-76.

**Schuman, S.** (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* **269**: 32678-32684.

**Schütz, M., Y. Shahak, E. Padan, G. Hauska.** (1997) Sulfide-Quinone Reductase from *Rhodobacter capsulatus* Purification, Cloning, And Expression. *J. Biol. Chem.* **272**:9890-4.

**Shima, S., R. K. Thauer.** (2007) A third type of hydrogenase catalyzing H<sub>2</sub> activation. *Chem. Rec.* **7**: 37-46.

**Sorgenfrei, O., D. Linder, M. Karasand, A. Klein.** (1993) A novel very small subunit of a selenium containing [NiFe] hydrogenase of *Methanococcus voltae* is postranslationally processed by cleavage at a defined position. *Eur J Biochem.* **213**:1355-8.

**Stal L.J., H. Van Gemerden, W.E. Krumbein.** (1984) The simultaneous assay of chlorophyll and



bacteriochlorophyll in natural microbial communities. *J Microbiol Methods* **2**, 295–306.

**Szilágyi, A., Kovács, K.L., Rákhely, G., Závodszky, P.** (2002) Homology modeling reveals the structural background of the striking difference in thermal stability between two related [NiFe] hydrogenases *J Mol Model* **8**:58-64.

**Tamagnini, P., R. Axelsson, P. Lindberg, F. Oxelfelt, R. Wüschiers, Lindblad, P.** (2002) Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **66**:1-20.

**Theodoratou, E., A. Paschos, A. Magalon, E. Fritsche, R. Huber, A. Böck.** (1995) Nickel serves as a substrate recognition motif for the endopeptidase involved in hydrogenase maturation. *Eur. J. Biochem.* **267**: 1995-9.

**Theodoratou, E., A. Paschos, W. Mintz, A. Böck.** (2000) Analysis of the cleavage site specificity of the endopeptidase involved in the maturation of the large subunit of hydrogenase 3 from *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **173**: 110-6.

**Tromp, T.K., R.L. Shia, M. Allen, J.M. Eiler, Y.L. Yung.** (2003) Potential environmental impact of a hydrogen economy on the stratosphere. *Science* **300**:1740-1742.

**Vergauwen, B., F. Pauwels, F. Jacquemotte, T.E. Meyer, M.A. Cusanovich, R.G. Bartsch, J.J. Van Beeumen** (2001). Characterization of glutathione amide reductase from *Chromatium gracile*. Identification of a novel thiol peroxidase (Prx/Grx) fueled by glutathione amide redox cycling. *J Biol Chem.* **276**:20890-7.

**Vignais, P. M., Dimon, B., Zorin, N. A., Colbeau, A. and Elsen, S.** (1997) HupUV proteins of *Rhodobacter capsulatus* can bind H<sub>2</sub>: evidence from the H-D exchange reaction. *J Bacteriol.* **179**:290-2.

**Vignais, P.M., B. Dimon, N.A. Zorin, M. Tomiyama, A. Colbeau.** (2000) Characterization of the

hydrogen-deuterium exchange activities of the energy-transducing HupSL hydrogenase and H<sub>2</sub>-signaling HupUV hydrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol.* **182**:5997-6004.

**Vignais, P.M., B. Billoud, J.Meyer.** (2001) Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:455-501.

**Vignais, P.M., A.Colbeau.** (2004) Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr Issues Mol Biol.* **6**:159-88.

**Vignais P.M., B. Billoud.** (2007) Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem Rev.* **107**:4206-72.

**Vignais P.M.** (2008) Hydrogenases and H<sup>+</sup>-reduction in primary energy conservation. *Results Probl Cell Differ.* **45**:223-52.

**Volbeda A., M.H. Charon, C. Piras, E.C. Hatchikian, M. Frey, J.C. Fontecilla-Camps.** (1995) Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature.* **373**:580-7.

**Volbeda A, L. Martin , C. Cavazza, M. Matho , B.W. Faber, W. Roseboom , S.P. Albracht, E. Garcin, M. Rousset, J.C. Fontecilla-Camps.** (2005) *J Biol Inorg Chem.* **10**:239-49.

**Wu, L.F., A. Chanal, A. Rodrigue.** (2000) Membrane targeting and translocation of bacterial hydrogenases. *Arch. Microbiol.* **173**:319-324.

**Zorin, N. A., P. Lindblad.** (1993) Localization of hydrogenase in the purple sulphur bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Arch. Microbiol.* **160**:96-100.